

Untersuchungen zur Initiation der Transkription in E. coli

Wolfgang Schulz

1982

Untersuchungen zur Initiation der

Transkription in E. coli

Inauguraldissertation .

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät

für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Wolfgang Schulz

aus Waren/Müritz

München 1982



1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Zillig
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1982

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Professor Zillig danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für ein Promotionsstipendium.

A	EINLEITUNG	1
B	ALLGEMEINE BEMERKUNGEN ÜBER IN VITRO-TRANSKRIP- TIONSSYSTEME	6
C	ERGEBNISSE	8
1.	Schrittweiser Aufbau eines ternären DNA- RNA-Enzymkomplexes	8
1.1	Darstellung von Initiationsoligonukleotiden	8
1.2	Eigenschaften des ternären Komplexes mit Trinukleotid	11
1.3	Abhängigkeit der Stabilität ternärer Kom- plexe von der Länge ihrer RNA	16
1.4	Stabilität der Komplexe bei hoher Ionenstärke	24
2.	Zur Wirkungsweise von Rifampicin	26
2.1	Die Entstehung höherer Oligonukleotide in Ge- genwart von Rifampicin	26
2.2	Einfluß der Rifampicinkonzentration auf die Produkteverteilung	30
2.3	Zum Mechanismus der Oligonukleotidentstehung in Gegenwart von Rifampicin	30
2.4	Kinetik der Trinukleotidsynthese in An- und Abwesenheit von Rifampicin	35
2.5	Der Einfluß von Rifampicin auf die Sta- bilität von ternären Initiationskomplexen	37
2.6	Die Unterdrückung der Rifampicinwirkung durch hohe Dinukleotidkonzentrationen	38
2.7	Die Wirkung von Rifampicin in Transkrip-	

	tionssystemen mit natürlicher DNA	39
2.7.1	Einfluß von Rifampicin auf den Pyrophosphat- austausch	40
2.7.2	Entstehung von Trinukleosidpentaphosphat in Gegenwart von Rifampicin	40
3.8	Die Reversibilität von Transkriptionsschritten	44
3.1	Die Bevorzugung von Adenosin am 3' terminalen Ende der RNA-Kette	44
3.2	Geschwindigkeit der Einzelschrittverlängerung	46
3.3	Der pyrophosphorolytische Ausbau des 3'termi- nalen Nukleotides	48
3.4	Pyrophosphorolyse und Pyrophosphataustausch unter Synthesebedingungen	52
3.5	Pyrophosphorolyse von RNA	55
D	DISKUSSION	60
E	MATERIAL UND METHODEN	72
1.	Chemikalien	72
2.	Materialien für die Chromatographie	73
3.	Nukleinsäuren und Enzyme	73
4.	Puffer	74
5.	Allgemeine Reaktionsbedingungen	75
6.	Konzentrationsbestimmungen	75
7.	Konstruktion eines Mikrofiltrators	76
8.	Polyacrylamidgelelektrophorese	77
9.	Autoradiographie	78
10.	Quantitative Bestimmung der im Gel aufge- trennten Produkte	78
11.	Elution von Oligonukleotiden aus	

dem Acrylamidgel	78
12. Dünnschichtchromatographie	79
13. Messung des Pyrophosphataustausches	80
14. Spaltung von pppApUpA mit RNase T2	80
15. Test auf Reinheit von Nukleosidtriphosphaten	81
16. Nachreinigung von $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP	81
17. Synthese von ApU	82
18. Separate Herstellung von pppApU	83
19. Separate Herstellung von pppApUpA und von pppApUpApU	84
20. Gemeinsame Herstellung von Di-, Tri- und Tetranukleotid	84
21. Isolierung eines ternären Initiationskomplexes mit Trinukleotid	85
22. Isolierung ternärer Initiationskomplexe im A-Raster	86
23. Isolierung ternärer Initiationskomplexe im U-Raster	86
24. Konzentrierung von ternären Komplexen	86
F ZUSAMMENFASSUNG	88
G LITERATURVERZEICHNIS	90
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
LEBENS LAUF	

A EINLEITUNG

Alle Organismen konservieren ihre genetische Information in der Primärstruktur ihrer Desoxyribonukleinsäuren. Diese Information muß einerseits unverfälscht an die Nachkommen weitergegeben werden (Vererbung) und andererseits in den Zellen zur Wirkung gelangen (Genexpression).

Die Entfaltung der Genwirkung verläuft in mehreren Abschnitten. Der erste ist die Transkription. Hier werden selektiv und spezifisch die aktuell benötigten Informationen von der DNA auf einen sekundären Informationsträger, die RNA, überschrieben. Entsprechend ihrer großen Bedeutung im Zellgeschehen ist die Transkription eines der zentralen Themen der Molekularbiologie.

Am besten untersucht ist das Transkriptionssystem des Darmbakteriums E. coli, das als repräsentativ für alle Eubakterien angesehen werden darf. Im Gegensatz zu den Eukaryonten, in denen es drei Klassen von Enzymen gibt, findet sich in den Bakterien nur ein einziges Enzym, das die Transkription der DNA, d.h. die spezifische RNA-Synthese, katalysiert. Diese "DNA abhängige RNA Polymerase" wurde aus einer ganzen Reihe von Bakterien isoliert. Das Enzym aus E.coli hat ein Molekulargewicht von ca. 500 000 und besteht aus mehreren Untereinheiten. Die Polypeptide α , β und β' konstituieren in der Stoechiometrie $\alpha_2\beta\beta'$ das sogenannte Core-Enzym, aus dem durch Hinzufügen des Initiationsfaktors σ das Holoenzym wird.

Mit der Isolierbarkeit der RNA Polymerase ist eine wichtige Voraussetzung für die in vitro Untersuchungen der Transkription gegeben. Die biochemischen in vitro Arbeiten haben in enger Verknüpfung mit biophysikalischen und genetischen Untersuchungen zu einer enormen Fülle von Daten geführt, aus denen ein Modell über die Grundprozesse der Transkription abgeleitet wurde. Danach ist der Gesamttranskriptionsvorgang ein zyklischer Prozess, der sich in Teilprozesse zerlegen läßt. Im ersten Teil bindet die RNA-Polymerase spezifisch an die DNA, wobei sie spezielle Signalstrukturen auf der Matrize (Promotoren) erkennt. Anschließend wird in der Initiationsreaktion, beginnend mit der Verknüpfung der beiden ersten Nukleosidtriphosphate, eine neue RNA-Kette angelegt. Diese wird in der Elongationsphase Schritt für Schritt bis zur reifen RNA verlängert. Das Enzym bleibt während dieser Reaktionen an die DNA gebunden und bildet dementsprechend zusammen mit der DNA und dem 3'-Hydroxylende der naszierenden RNA den ternären aktiven Elongationskomplex. Erst beim Erreichen eines Terminations-signals auf der DNA wird die RNA-Synthese gestoppt. Der Komplex aus DNA, RNA und Enzym dissoziiert und die RNA-Polymerase kann mit der erneuten Bindung an einen Promotor einen neuen Transkriptionszyklus beginnen.

Alle vier genannten Abschnitte: spezifische Bindung, Initiation, Elongation und Termination sind selbst ziemlich komplexe Reaktionen, die bisher trotz intensiver Untersuchungen nur ungefähr verstanden sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der frühen Elongations- und vor allem mit der Initiationsreaktion. Da dieser Begriff oft unterschiedlich benutzt wird, kommt es gelegentlich zu Mißverständnissen. Hier wird die ganze Folge von Reaktionsschritten, die mit der Phosphodiesterverknüpfung der beiden ersten Nukleosidtriphosphate beginnt, zur Initiation gerechnet. Als abgeschlossen gilt die Initiationsphase, wenn RNA Polymerase, DNA und naszierende RNA einen stabilen ternären Komplex bilden.

Abgesehen von den Befunden von Bremer et al. (1965) über eine vorzeitige Termination der Transkription sprach bis zu den Arbeiten von Johnston und McClure (1976) über die abortive Initiation alles für die Vorstellung, daß mit der Bindung und Verknüpfung der beiden Startnukleosidtriphosphate der Initiationsvorgang im wesentlichen abgeschlossen ist, und das entstandene Dinukleosidtetraphosphat nun in einer mehr oder weniger monotonen Folge von Elongationsschritten zur reifen RNA verlängert wird. Diese Auffassung läßt sich in zweierlei Hinsicht nicht aufrechterhalten: zum einen wurde gezeigt, daß die intermediären Oligonukleotide nicht immer zur reifen RNA verlängert werden, sondern daß die Möglichkeit ihrer vorzeitigen Dissoziation vom Transkriptionskomplex besteht (abortive Initiation). Das gilt nicht nur für das Di- und Trinukleotid (Hansen und McClure, 1980,a), sondern auch noch für höhere Oligonukleotide (bis zu einer Länge von ca. 9 Nukleotidresten). Die Zahl der dissoziierten Oligonukleotidmoleküle kann die der reifen RNA

Moleküle sogar um ein vielfaches übertreffen (Carpousis und Gralla, 1980; Gralla et al., 1980). Außerdem stellt sich mehr und mehr heraus, daß die Elongationsreaktion als gleichmäßige Folge von untereinander sehr ähnlichen Schritten in einer zu vereinfachten Weise beschrieben wurde (Kingston und Chamberlin, 1981). Für eine detaillierte Analyse der Elongation wäre es sehr vorteilhaft, wenn alle RNA Polymerasemoleküle in den aktiven ternären Komplexen eine genau gleiche Position auf der DNA einnehmen würden. Dieser Zustand ist in den normalen in vitro-Transkriptionssystemen nicht verwirklicht. Vielmehr stellt sich hier bald nach dem Start der Reaktion eine zunehmende Asynchronie ein. Die Idee, die Transkriptionsreaktion streng synchron zu führen, um auf diese Weise zu den gewünschten definierten Elongationszuständen zu gelangen, stand am Anfang der vorliegenden Arbeit. Das Konzept bestand darin, einen binären Enzym-DNA-Komplex, in kontrollierter Weise Schritt für Schritt in einen aktiven ternären Elongationskomplex zu überführen. Außer der Erprobung der entsprechenden Techniken waren dabei die Eigenschaften der intermediären Komplexe selbst von Interesse. Insbesondere wurde ihre Stabilität und deren Beeinflussung durch das Antibiotikum Rifampicin untersucht. Dies führte zu einer neuen Hypothese über dessen Wirkungsweise.

Die Initiation, wie sie hier definiert wurde, geht fließend in die Elongation über. Das brachte, beinahe zwangsläufig, die Analyse einiger spezieller Aspekte dieser Reaktionsphase mit sich. Besondere Aufmerksamkeit wurde

dabei der Frage nach der Reversibilität der Transkription,
also der pyrophosphorolytischen Spaltung der RNA, gewidmet.

B ALLGEMEINE BEMERKUNGEN ÜBER IN VITRO-TRANSKRIPTIONSSYSTEME

In einem in vitro-Transkriptionsansatz sind neben den Salzen als essentielle Bestandteile die DNA, die RNA-Polymerase und die Ribonukleosidtriphosphate ATP, UTP, CTP und GTP enthalten. Bei der Zugabe des Enzyms zur DNA bindet es spezifisch an die Promotoren. Der so entstandene binäre Enzym-DNA-Komplex isomerisiert in einer stark temperaturabhängigen reversiblen Reaktion zum sogenannten "offenen Komplex" bei dem die vom Enzym bedeckte DNA partiell geschmolzen ist. Dieser kann nun in der durch die Sequenz des kodogenen DNA Stranges diktierten Reihenfolge die Nukleosidtriphosphate binden und miteinander verknüpfen. Dabei wird aus dem binären Komplex der ternäre Elongationskomplex. Bei diesem Übergang treten eine Reihe von Eigenschaftsänderungen auf: der Komplex wird stabil gegen hohe Ionenstärke und bleibt auch bei niedrigen Temperaturen intakt. Das Enzym verliert seine Anfälligkeit gegen das Antibiotikum Rifampicin und entläßt den bis dahin gebundenen σ -Faktor.

Bei Untersuchungen, bei denen Produkte nachgewiesen und analysiert werden müssen, die nur stoechiometrisch oder sogar substoechiometrisch zur RNA-Polymerase entstehen, gelangt man leicht an die Nachweisgrenzen, oder muß die Unbequemlichkeit sehr großer Reaktionsansätze und hoher Radioaktivität in Kauf nehmen. Das liegt in der Hauptsache an den relativ niedrigen DNA Mengen in den Reaktionsansät-

zen. Üblicherweise kann man nämlich wegen der hohen Viskosität keine höheren DNA-Konzentrationen als ca. 0.1-0.15 mg/ml verwenden. Da die interessierenden Promotorregionen aber nur einen winzigen Bruchteil der gesamten DNA-Menge darstellen, wird die Konzentration der aktiven RNA-Polymerase ausgesprochen gering.

Ideal wäre die Verwendung von kurzen gereinigten DNA-Fragmenten, die einen Promotor tragen. In jüngster Zeit sind durch die Anwendung der molekularen Klonierungstechniken auch große Fortschritte in dieser Richtung erzielt worden.

Für viele Zwecke ist auch das synthetische Desoxypolynukleotid poly[d(A-T)] gut zu verwenden. poly[d(A-T)] ist eine doppelsträngige DNA, die sich in streng alternierender Weise aus den Desoxyribonukleotiden dAMP und dTMP aufbaut. In gewissem Sinne ähnelt das Polynukleotid den eubakteriellen Promotoren, da diese häufig sehr AT-reich sind. Deutlicher wird die Ähnlichkeit in funktioneller Hinsicht: die RNA Polymerase kann sehr fest an poly[d(A-T)] binden, RNA-Ketten initiieren und sie zu erheblicher Länge elongieren. Da poly[d(A-T)] naturgemäß keine nichttranskribierbare Region enthält, lassen sich dementsprechend hohe RNA Polymerasekonzentrationen einsetzen. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb weitaus die meisten Untersuchungen im poly[d(A-T)]-System durchgeführt.

Ein Teil der hier zu berichtenden Ergebnisse ist bereits veröffentlicht (Schulz, W. und Zillig, W. (1981)).

C ERGEBNISSE

1. Schrittweiser Aufbau eines ternären DNA-RNA-Enzymkomplexes

Zur Analyse des Überganges vom binären RNA-Polymerase-DNA-Komplex in den ternären Elongationskomplex ist es wünschenswert, die Folge der beteiligten Reaktionen in möglichst kleine Einzelschritte aufzulösen, um diese dann gesondert untersuchen zu können.

1.1 Darstellung von Initiationsoligonukleotiden

Im poly[d(A-T)]-System sind die beiden ersten Nukleosidtriphosphate, ATP und UTP, auch gleichzeitig die Elongationssubstrate. Wenn man sie daher zu einem binären Komplex hinzufügt, bleibt die Reaktion nicht beim Dinukleosiddtetraphosphat stehen, sondern führt weiter zum hochmolekularen poly[r(A-U)]. Trotzdem läßt sich eine kontrollierte Initiation vornehmen. Man kann nämlich das unter anderen Bedingungen hergestellte (siehe Material und Methoden) pppApU als "Starter" benutzen und am binären Enzym-DNA-Komplex durch Zugabe von ATP zum Trinukleotid pppApUpA verlängern. Die Reaktion ist auch im präparativen Maßstab durchführbar, wodurch man in den Besitz von Trinukleotid gelangt. Das Trinukleotid läßt sich in analoger Weise zum pppApUpApU, und dieses wiederum zum pppApUpApUpA verlängern. Abb. 1 zeigt ein Autoradiogramm eines Polyacrylamid-Harnstoffgels, in dem

Abb. 1: Spezifische Synthese von Oligonukleotiden

Reaktionsansätze mit binären Enzym-DNA-Komplexen wurden mit Substrat gemischt und 3 Stunden bei 37 °C weiterinkubiert. a: Ansatz enthielt neben T7-D111-DNA (0.1 mg/ml) und 20 µg/ml Rifampicin, 0.1 mM ATP und 5 µM $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP.

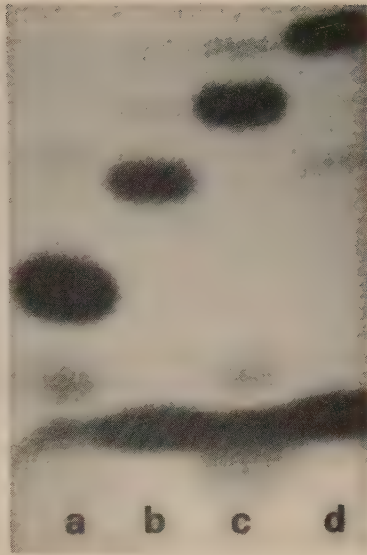
Ansätze b-d enthielten 0.1 mg/ml poly[d(A-T)], 0.1 mg/ml Enzym und

b: pppApU (0.05 mM), $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (5 µM)

c: pppApUpA (0.05 mM), $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (5 µM)

d: pppApUpApU (Konzentration war unbekannt), $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP

5 µl von jedem Ansatz wurden auf ein 20% Acrylamid-Harnstoffgel aufgetragen. Vom Gel wurde ein Autoradiogramm angefertigt.



die Reaktionsprodukte der entsprechenden Ansätze aufgetrennt worden waren. In Spur a ist ein an T7-DNA unter Rifampicin hergestelltes pppApU als Referenz zu sehen. Spur b, c und d zeigen Tri-, Tetra- und Pentanukleotid, das sich aus seinem unmarkierten Vorläufer und dem $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten ATP bzw. UTP gebildet hatte. Abgesehen von ihrer Herstellungsweise läßt sich aus den abgestuften Änderungen ihrer elektrophoretischen Beweglichkeiten schließen, daß es sich wirklich um die erwarteten Oligonukleotide handelt. Für das Reaktionsprodukt in b (pppApUpA) wurde ein zusätzlicher Konstitutionsbeweis vorgenommen, der auf radioaktiver Markierung spezifischer Positionen im Molekül und Analyse der Bruchstücke nach Spaltung mit RNase T2 beruht. Das Autoradiogramm eines Dünnschichtchromatogramms der Spaltprodukte ist in Abb. 2

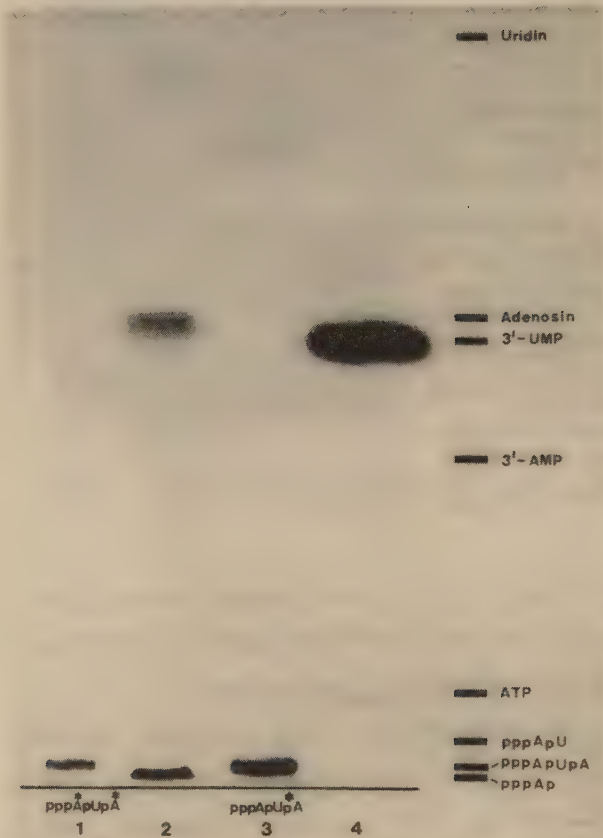


Abb. 2: Autoradiogramm eines PEI-Dünnschichtchromatogramms (Laufmittel: 0.15 M Phosphatpuffer) zur Charakterisierung der Spaltprodukte von pppApUpA nach Behandlung mit RNase T2

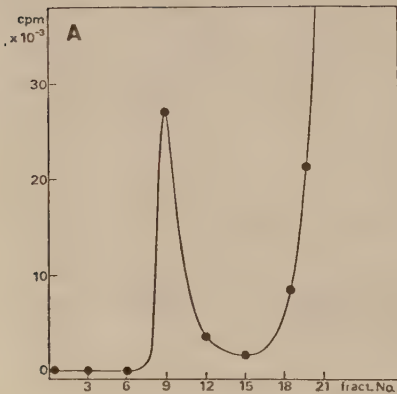
- 1: ungespaltenes Trinukleotid, ^{14}C -Markierung der Adenosinreste (beide mit gleicher spezifischer Radioaktivität) ist mit Sternchen gekennzeichnet (Herstellung: siehe Material und Methoden)
- 2: Spaltprodukte aus (1) nach Behandlung mit RNase T2
- 3: ungespaltenes Trinukleotid, ^{32}P -Markierung der mit Sternchen bezeichneten Position
- 4: Spaltprodukte aus (3) nach T2-Behandlung

Am rechten Rand ist die Position von Referenzsubstanzen angegeben.

gezeigt. Die beiden Bruchstücke pppAp und Adenosin (Spur 2) wurden im Verhältnis 1:1 gebildet (die quantitative Auswertung erfolgte nach Auskratzen der Banden aus der Dünnschichtplatte) und vom 3'-terminalen AMP erfolgte ein Transfer des Phosphates zum Uridin (Spur 3 $\rightarrow$ 4).

1.2 Eigenschaften des ternären Komplexes mit Trinukleotid

Die Bildungskinetik von pppApUpA, die im Kapitel über die Wirkungsweise des Rifampicins ausführlicher diskutiert wird, ließ vermuten, daß die Dissoziation des Trinukleodides vom Enzym-DNA-Komplex relativ langsam erfolgt. Es bestand daher die Hoffnung, einen intakten ternären Komplex zu isolieren und genauer zu untersuchen. Wie in Abb. 3 gezeigt, erhält man bei tiefen Temperaturen (4 °C) einen Komplex aus poly [d(A-T)], RNA-Polymerase und Trinukleotid im Ausschlussvolumen einer Sepharose 4B-Säule. Die Analyse der Fraktionen aus dem Ausschluß-bzw. dem Salzvolumen der Säule (Abb. 3B) deutet auf eine mittlere Bindungsfestigkeit des Trinukleotides hin, denn es findet sich sowohl in freier Form als auch komplexgebunden. Eine quantitative Aussage über die Stabilität des Trinukleotidkomplexes ergibt sich aus seiner Zerfallskinetik, die in der ersten Phase einen logarithmischen Verlauf zeigt (Abb. 4). Mit der Annahme, daß nur eine Art von ternärem Komplex vorliegt und daß seine Dissoziation tatsächlich eine Reaktion 1. Ordnung ist, ergibt sich eine Halbwertszeit von 17 - 20 min. bei 22 °C. Bei 0 °C ist die



B

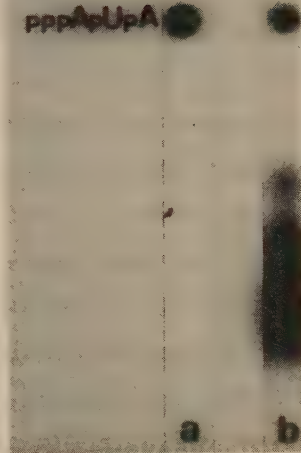


Abb. 3 : Isolierung eines ternären Komplexes mit Trinukleotid

A: Elutionsprofil einer Sepharose 4B-Säule, auf die ein poly [d(A-T)]-, Eo-, pppApU- und $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP-enthaltender Reaktionsansatz aufgetragen worden war. Gemessen wurde die Cerenkov-Strahlung von Proben aus den einzelnen Fraktionen.

B: Gelchromatographische Analyse von Fraktion 9 (Spur a) und Fraktion 22 (Spur b)

Lebensdauer mehr als 10 mal größer. Die Zerfallskinetik wurde auf zweierlei Weise gemessen: Zur direkten Messung der Dissoziationsrate wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten Proben eines isolierten, im Trinukleotid markierten ternären Komplexes erneut auf Sepharose 4B - Säulen gegeben. Aus der relativen Menge von Radioaktivität im Ausschlußvolumen wurde dann der Anteil von nichtdissoziiertem Komplex errechnet. Die Darstellung ist in Abb. 4 zu sehen.

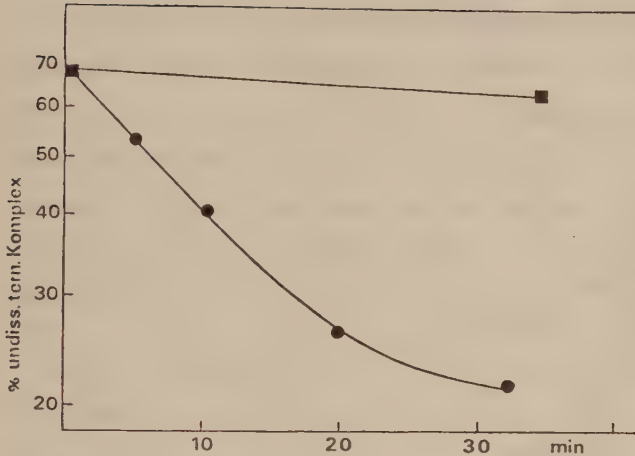


Abb. 4: Zerfallskinetik eines ternären Komplexes mit Trinukleotid

Der isolierte ternäre Komplex mit radioaktiv markiertem Trinukleotid wurde bei 22 °C bzw. bei 0 °C inkubiert. 5 µl Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und auf kleinen Sepharose 4B-Säulen rechromatographiert. Die relative Menge von undissoziiertem Komplex ergab sich aus dem Verhältnis der Radioaktivität im Ausschlußvolumen der Säule zu dem insgesamt eluierten.

•: 22 °C, ■: 0 °C

Der Anteil von ternärem Komplex, der nach verschiedenen Inkubationszeiten funktionell noch intakt war, wurde durch seine Fähigkeit bestimmt, das Trinukleotid zu hochmolekularer RNA zu verlängern. Dazu wurden Proben des isolierten Komplexes mit ATP und UTP inkubiert und dann auf PEI - Dünnschichtplatten aufgetragen. Die relative Menge von aktivem ternären Komplex wurde aus der Radioaktivität, die nach Entwicklung der Dünnschichtplatte am Start liegenblieb (hochmolekulare RNA) errechnet (Abb. 5, Kurven a und b).

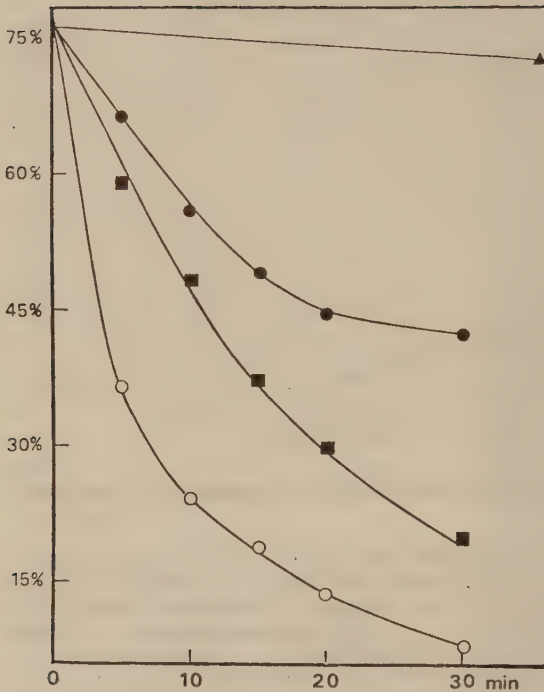


Abb. 5: Stabilität ternärer Trinukleotidkomplexe

5 μ l Proben eines isolierten ternären Komplexes mit markiertem pppApUpA (Kurve a, b und c) bzw. eines Komplexes mit ApUpA (Kurve d) wurden zu den angegebenen Zeiten mit ATP und UTP (Endkonzentration: 0,5 mM) versetzt und 4 min bei 22 °C weiterinkubiert.

Die Proben wurden auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen. Nach der Entwicklung des Chromatogramms wurde aus der relativen Radioaktivitätsmenge am Start (hochmolekulare RNA) die Menge des funktionell intakten Komplexes ermittelt.

▲ (Kurve a): Zerfall des Komplexes mit pppApUpA, 0 °C, Niedrigsalzbedingungen

● (Kurve b): Zerfall des Komplexes mit pppApUpA, 22 °C, Niedrigsalzbedingungen

○ (Kurve c): Zerfall des Komplexes mit pppApUpA, 22 °C, plus 0,25 M KCl

■ (Kurve d): Zerfall des Komplexes mit ApUpA, 22 °C, Niedrigsalzbedingungen

Sylvester und Cashel (1980) berichteten 1980 über die Isolierbarkeit eines ternären Komplexes, der an Stelle von pppApUpA ApUpA enthielt. Es erschien interessant, die Stabilität der beiden Trinukleotidkomplexe miteinander zu vergleichen. Der schnellere Zerfall eines zu diesem Zweck isolierten ApUpA-Komplexes beweist den positiven Beitrag der 5'-terminalen Triphosphatgruppe zur Bindung (Kurve c in Abb. 5).

Einen negativen Einfluß auf die Stabilität hat die Ionenstärke der Lösung. Bei einer Erhöhung der KCl-Konzentration um 0.25 M erfährt der Zerfall des Komplexes eine starke Beschleunigung (Kurve d in Abb. 6). Der ternäre Komplex mit Trinukleotid verhält sich in dieser Hinsicht wie ein binärer Enzym - DNA - Komplex, in dem die Bindung zwischen Protein und Nukleinsäure ausgesprochen salzempfindlich ist.

In der oben erwähnten Publikation ziehen Sylvester und Cashel den Schluß, daß zur Bildung eines stabilen ternären Komplexes die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung eine unabdingbare Voraussetzung ist, daß also direkt aus den Komponenten poly[d(A-T)], Enzym und Trinukleotid *k e i n* funktionsfähiger Komplex entsteht. Diese Aussage ließ sich nicht bestätigen. Vielmehr konnte, wenn man die Komponenten bei 22 °C miteinander inkubierte, im Ausschlußvolumen einer Sepharose 4B - Säule in üblicher Weise ein ternärer Komplex isoliert werden, der ununterscheidbar (Fähigkeit zur Verlängerung seines Trinukleotides, Halbwertszeit, Resistenz gegen Rifampicin) von solch einem war, bei dem das Tri-

nukleotid durch in situ Verlängerung des Dinukleotides entstanden war.

1.3 Abhängigkeit der Stabilität ternärer Komplexe von der Länge ihrer RNA

Da sich kein ternärer Komplex mit einem Dinukleotid isolieren ließ, der Komplex mit einem Trinukleotid eine mittlere Stabilität und Komplexe mit hochmolekularer RNA eine hohe Stabilität zeigen, liegt die Vermutung nahe, daß die Festigkeit der Bindung des Oligonukleotides an den Enzym-DNA-Komplex mehr oder weniger eine einfache Funktion der RNA-Länge ist. Dies ließ sich jedoch, zumindest im poly [d(A-T)]-System, nicht bestätigen. Alle Versuche, einen Komplex mit Tetranukleotid zu isolieren, blieben erfolglos. Es war dabei gleichgültig, ob das pppApUpA eines entsprechenden isolierten ternären Komplexes durch Zugabe von UTP zum Tetranukleotid verlängert, oder ein binärer Enzym-DNA-Komplex zusammen mit pppApUpA und UTP inkubiert wurde. In beiden Fällen ließ sich zwar mit Acrylamidgelelektrophorese die Bildung von pppApUpApU nachweisen, ohne daß es aber möglich war, im Ausschlussvolumen einer Sepharose 4B-Säule, einen ternären Komplex mit Tetranukleotid zu entdecken.

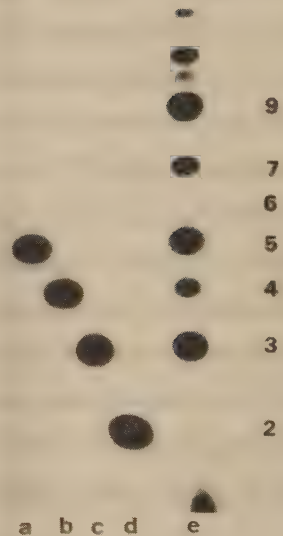
Damit erwies sich der ursprüngliche Plan, das Trinukleotid in einem ternären Komplex Schritt für Schritt zu verlängern, als undurchführbar. Die Darstellung eines Komplexes mit Pentanukleotid aus pppApUpApU und ATP war

andererseits auch nicht möglich, da zunächst keine ausreichenden Mengen Tetranukleosidhexaphosphat zur Verfügung standen.

Zur Untersuchung der Stabilitätsfrage wurde deshalb ein alternativer Weg beschritten. Statt des Versuches, ternäre Komplexe mit einheitlicher Länge ihrer Oligonukleotide herzustellen, und diese dann jeweils um einen Schritt zu verlängern, wurden Reaktionsbedingungen gewählt, bei denen eine ganze Serie von Komplexen mit unterschiedlich langen Oligonukleotiden entstehen sollten. Dazu wurde ein binärer poly[d(A-T)] - Enzym - Komplex unter Verwendung von pppApU als Initiationsstarter mit niedrigen ATP und UTP Konzentrationen inkubiert. Die ATP und UTP Konzentrationen (1×10^{-6} M) wurden zuerst so gewählt, daß im Durchschnitt jedes Enzym (2×10^{-7} M) bei Verbrauch sämtlichen Substrates eine RNA-Kette mit ca. 10 Nukleotiden synthetisiert haben sollte. Diese Erwartung erfüllte sich nicht. Die entstandenen Oligonukleotide hatten ein erheblich höheres Molekulargewicht. Eine für die anschließenden Untersuchungen günstige Größenverteilung der Produkte ergab sich erst bei Verwendung einer viel niedrigeren Substratkonzentration. Abb. 6 zeigt die Produkte einer Reaktion, in der die Konzentration der Nukleosidtriphosphate gleich der der RNA - Polymerase (2×10^{-7} M) war. Trotz der stoechiometrischen Menge Substrat bildet sich erstaunlicherweise mehr Penta- und Nonanukleotid als Trinukleotid, welches eigentlich mehr oder weniger das einzige Produkt sein sollte. Möglicherweise

Abb. 6: Reaktionsprodukte bei Verwendung sehr niedriger Substratkonzentrationen

Gelelektrophoretische Analyse eines Reaktionsansatzes mit poly[d(A-T)], RNA-Polymerase, pppApU (50 μ M), α^{32} P-ATP (0.1 μ M) und UTP (0.1 μ M) (Spur e). 15 Minuten nach Substratzugabe zum binären Enzym-DNA-Komplex wurde die Reaktion durch Zugabe von "Stop-Puffer" abgebrochen. Spuren a-d enthalten als Referenz isoliertes Penta-, Tetra-, Tri- und Dinukleotid. Am rechten Rand ist die Länge der Oligonukleotide angegeben.



war das dadurch bedingt, daß nur ein Bruchteil des Enzyms überhaupt initiieren konnte.

Die gebildeten Oligonukleotide stellen entweder abortive, d.h. aus dem Komplex freigesetzte Produkte dar, oder gehören zu aktiven ternären Komplexen, die in ihrer Elongation gestoppt sind, ihr Oligonukleotid aber bei Erhöhung der Substratkonzentration zu hochmolekularer RNA verlängern würden. Zwischen den Alternativen ließ sich mit Hilfe eines "chase"-Experimentes entscheiden: Dazu wurden zu einem Reaktionsgemisch, in dem sich bereits die radioaktiven Oligonukleotide bilden konnten, große Mengen (1 mM) nichtradioaktiver Substrate hinzugegeben. Damit wurde eine sehr starke Isotopenverdünnung erreicht, die dafür sorgt, daß neu angelegte RNA-Ketten und Oligonukleotide so gut wie keine radioaktive Markierung besaßen. Aus Abb. 7 geht deutlich hervor, daß das Trinukleotid zum Teil, das Tetranukleotid gar nicht und die höheren im Reaktionsgemisch befindlichen Oligonukleotide vollständig zu hochmolekularer RNA verlängerbar sind. Dieser Befund wird bestätigt durch die gelchromatographische Analyse der Oligonukleotide im Außschluß-bzw. im Salzvolumen einer Sepharose 4 B - Säule, auf die der Reaktionsansatz gegeben wurde (Abb. 8). Ein Teil des Trinukleotides, und sämtliches Tetranukleotid eluieren im Salzvolumen, während die höheren Oligonukleotide stabil gebunden, zusammen mit der DNA und dem Enzym eluieren.

Abgesehen vom Tetranukleotid läßt sich über die Bindungsfestigkeit der Oligonukleotide, deren 3'-terminale Base ein Uridin ist, auf der Basis der bisherigen Experimente nichts aussagen, weil unter den gewählten

Abb. 7: Dissoziation der Oligonukleotide vom aktiven Komplex; Test auf Verlängerbarkeit durch Erhöhung der Nukleosidtriphosphatkonzentration

Zu einem wie in Abb. 6 und in Material und Methoden beschriebenen Reaktionsgemisch wurden nicht-markiertes ATP und UTP im Überschuß (1 mM) gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 22 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von "Stop-Puffer" abgebrochen. Die Reaktionsgemische wurden gelelektrophoretisch untersucht.

Spur a: Referenz (Di-, Tri-, Tetranukleotid)
 Spur b: Gemisch vor der Zugabe von Nukleosidtriphosphaten
 Spur c: Gemisch nach der Zugabe von Nukleosidtriphosphaten

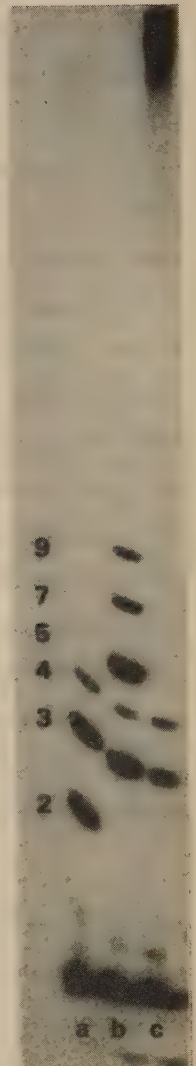


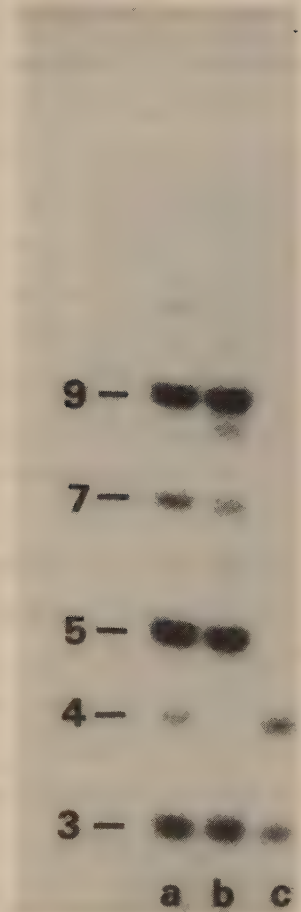
Abb. 8: Dissoziation der Oligonukleotide vom aktiven Komplex; Test auf Unversehrtheit mittels Gelchromatographie

Ein Reaktionsgemisch mit nicht isolierten ternären Initiationskomplexen (vgl. Abb. 6 und Material und Methoden) wurde an Sepharose 4B chromatographiert. Proben aus dem Ausschlußvolumen bzw. dem Salzvolumen der Säule wurden gelelektrophoretisch analysiert.

a: Reaktionsgemisch vor Chromatographie an Sepharose 4B

b: Probe aus dem Ausschlußvolumen

c: Probe aus dem Salzvolumen



Reaktionsbedingungen nur Oligonukleotide entstehen, die auf Adenosin enden (A-Komplexe). Dies gilt sogar, wenn die UTP-Konzentration im Reaktionsansatz die des ATPs um mehr als das zweifache übersteigt. Eine Erklärung für dieses Phänomen ergibt sich aus den in Abschnitt C.3 gezeigten Daten und soll hier deshalb nicht weiter erörtert werden.

Ein gut durchführbares Verfahren, zu den ternären Komplexen zu gelangen, deren Oligonukleotide auf Uridin enden (U-Komplexe), besteht darin, isolierte A-Komplexe mit UTP zu inkubieren. Die auf diese Weise erreichte Verlängerung der Oligonukleotide um genau einen Schritt ist in Abb. 9 (a $\rightarrow$ b) gezeigt. Durch zusätzliche Zugabe von ATP nach 10 min Inkubation lassen sich alle Oligonukleotide bis auf das Tetranukleotid zu hochmolekularer RNA verlängern (Spur c in Abb. 9). Ein kleiner Teil des Hexanukleotides scheint allerdings während der Inkubationszeit ebenfalls vom aktiven Komplex abdissoziiert zu sein. Das gleiche Ergebnis bezüglich der Stabilität der U-Komplexe erhält man bei der Analyse durch Chromatographie an Sepharose 4B (Abb. 10): Das Tetranukleotid pppApUpApU erscheint ausschließlich im Salzvolumen der Säule (Abb. 10, Spur c), ist also nicht komplexgebunden. Eine geringe Menge des Hexanukleotides ist ebenfalls freigesetzt, die Hauptmenge ist jedoch stabil an den Komplex gebunden (Spur b). Die höheren Oligonukleotide gehören zu stabilen ternären Komplexen.

Zusammenfassend läßt sich für die Stabilität der ternären Komplexe bezüglich der Abdissoziation ihrer Oligonukleotide im poly[d(A-T)]-System die Reihenfolge Di-, Tetra-, Tri-, Hexa-, Pentanukleotid angeben. Die Stabilität nimmt also im Prinzip zwar mit der Länge der RNA zu, wobei die Komplexe im A-Raster aber eine ausgeprägt höhere Stabilität haben als die im U-Raster.

Abb. 9: Funktioneller Test der Stabilität von U-Komplexen

Isolierte ternäre Komplexe im A-Raster (vgl. Abb. 8, Spur a) wurden 5 min bei 22 °C mit 10 μ M UTP inkubiert. Zu einem Teil des Reaktionsansatzes wurde dann zusätzlich ATP (10 μ M) gegeben und 5 Minuten weiterinkubiert. Die Analyse der Gemische erfolgte durch Acrylamid-gelelektrophorese.

a: isolierte ternäre Komplexe im A-Raster

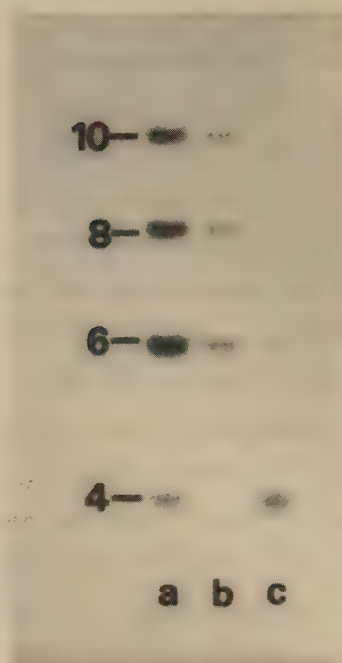
b: Zugabe von UTP

c: Zugabe von UTP und später zusätzlich von ATP



Abb. 10: Stabilität von U-Komplexen; Isolierbarkeit durch Gelchromatographie

Das Reaktionsgemisch mit den ternären Initiationskomplexen im U-Raster (Abb. 9, Spur b) wurde an Sepharose 4B chromatographiert. Spur a des Acrylamidgels: Probe aus dem Reaktionsgemisch vor Auftrag auf die Säule
Spur b: Probe aus dem Ausschlußvolumen der Säule
Spur c: Probe aus dem Salzvolumen



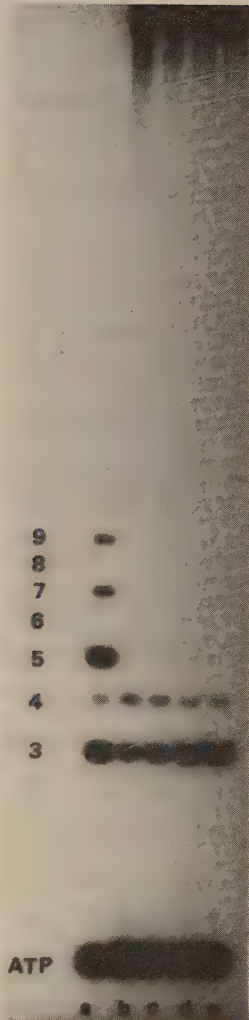
1.4 Stabilität der Komplexe bei hoher Ionenstärke

Für den isolierten ternären Komplex mit Trinukleotid wurde ein beschleunigter Zerfall bei hoher Ionenstärke gefunden (Abb. 5). Die Empfindlichkeit gegen Salz verschwindet, wenn die naszierende RNA eine gewisse Länge erreicht hat. Diese kritische Länge liegt, zumindest im poly [d(A-T)]- System, schon bei 5 Nukleotidresten. Komplexe mit diesem oder einem längeren Oligonukleotid bleiben unter Hochsalzbedingungen funktionell völlig intakt, denn ihr Oligonukleotid läßt sich durch Zugabe von ATP und UTP zu hochmolekularer RNA verlängern (Abb. 11).

Abb. 11: Stabilität von ternären Komplexen bei hoher Ionenstärke

In einem Reaktionsgemisch, in dem sich ternäre Initiationskomplexe gebildet hatten (vgl. Abb. 6), wurde die Ionenstärke durch Zugabe von KCl (Endkonzentration: 0.25 M) erhöht. Nach einer Inkubation von 5, 10, 15 und 20 Minuten bei 22 °C wurden Proben mit 1 mM ATP und UTP versetzt und 5 Minuten weiterinkubiert. Die Reaktion wurde durch Acrylamidgelelektrophorese verfolgt

a: Ausgangsgemisch;
b-e: Zugabe der unmarkierten Nukleosidtriphosphate 5 min (b), 10 min (c), 15 min (d) und 20 min (e) nach Erhöhung der Ionenstärke.



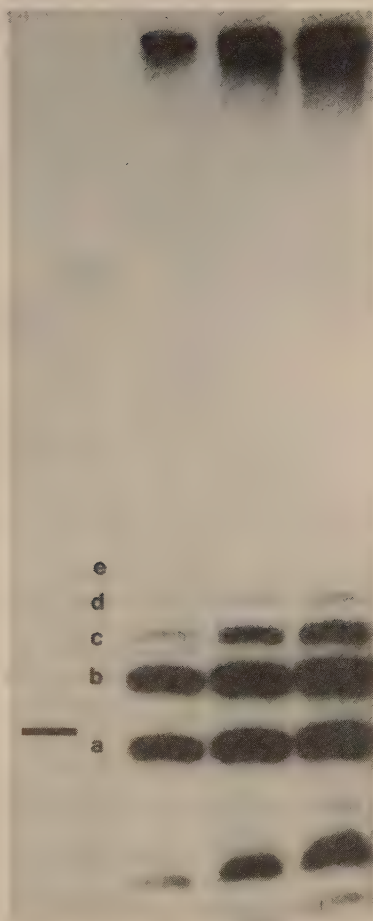
2. Zur Wirkungsweise von Rifampicin

2.1 Die Entstehung höherer Oligonukleotide in Gegenwart von Rifampicin

Das Dinukleosidtetraphosphat pppApU wurde, wie im Methodenteil beschrieben, zunächst mit T7-DNA als Matrize hergestellt. Mit dem Gedanken, die Ausbeuten zu erhöhen, bzw. die Produktionszeiten zu verkürzen, wurde dann aber poly[d(A-T)] als Matrize verwendet. In Gegenwart von Rifampicin sollte nach McClure und Cech (1978) das Dinukleotid pppApU als einziges Reaktionsprodukt aus ATP und UTP entstehen. Die Synthese höherer Oligonukleotide ist nach dem Modell von McClure über die Wirkungsweise des Antibiotikums aus sterischen Gründen ausgeschlossen. Daher war es ziemlich überraschend, als bei der dünnschichtchromatographischen Analyse eines poly[d(A-T)] geprägten pppApU-Syntheseansatzes neben dem erwarteten Dinukleotid noch weitere Reaktionsprodukte auftauchten. Die von mir zunächst verwendeten Dünnschichtsysteme waren nicht gut zur Charakterisierung dieser Produkte geeignet, und so blieb es zunächst unklar, ob ihr Auftauchen überhaupt Interesse verdiente. Erst bei den Arbeiten über die schrittweise Initiation, in deren Verlauf Erfahrungen mit hochauflösenden Trennsystemen gesammelt und außerdem verschiedene Oligonukleotide synthetisiert worden waren, wurde das Problem erneut aufgegriffen. Abb. 12 zeigt das Autoradiogramm eines

Abb. 12: Oligonukleotidbildung
in Gegenwart von Rifampicin

Ein Reaktionsansatz, in dem sich in Gegenwart von Rifampicin ein binärer poly[d(A-T)]-Enzym-Komplex bilden konnte, wurde mit ATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (50 μM bzw. 5 μM) versetzt und 4 Stunden bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Acrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Von links nach rechts steigende Mengen. Der Balken am linken Rand deutet die Position des Farbstoffes Orange G an.



Polyacrylamid-Harnstoff-Gels, auf das ein Rifampicin enthaltender, poly[d(A-T)] geprägter Transkriptionsansatz nach 4 stündiger Reaktion aufgetragen worden war. Neben dem erwarteten pppApU (Bande a) sind eine Reihe weiterer Produkte zu erkennen. Abgesehen von einer kleinen Menge von hochmolekularem Material, das kaum in das Gel hineingewandert ist, handelt es sich um niedermolekulare Produkte, die

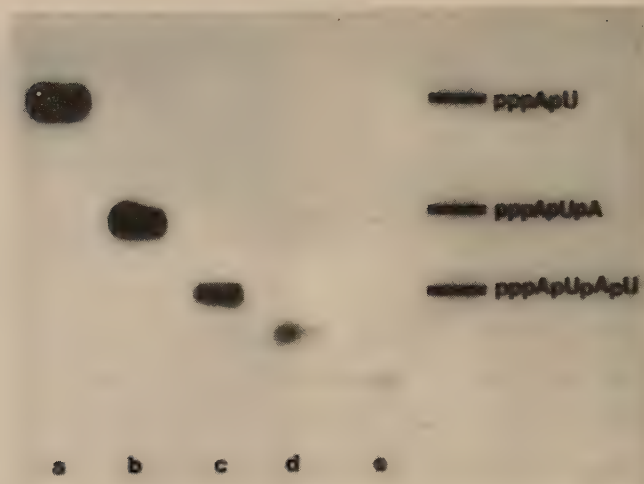


Abb.13: Dünnschichtchromatographische Analyse der Oligonukleotide aus Abb. 12

Die aus dem Acrylamid (Abb. 12) eluierten Substanzen wurden auf ein PEI-Dünnschichtplatten aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte in 0.3 M Phosphatpuffer. Die Buchstaben korrespondieren mit den Banden in Abb. 12. Am rechten Rand ist die Position von Referenz-Oligonukleotiden angegeben.

mit pppApUpA, pppApUpApU und pppApUpApUpA identifiziert werden konnten. Zu diesem Zweck wurde gezeigt, daß die Positionen der Banden genau den von gesondert synthetisierten Referenzen (pppApU, pppApUpA, pppApUpApU bzw. pppApUpApUpA) entsprechen. Diese Übereinstimmung ergibt sich auch für die Beweglichkeiten in der Anionenaustausch-Dünnschichtchromatographie. Abb. 13 zeigt ein Autoradiogramm eines PEI-Dünnschichtchromatogramms der aus dem Gel herausgeschnittenen und isolierten Banden. Die Positionen der Referenzoligonukleotide sind am rechten Rand vermerkt. Als ein zusätzlicher Konstitutionsbeweis sei noch erwähnt, daß man die gleichen Produkte im Acrylamidgel findet, wenn



Abb. 14: Markierung von Oligonukleotiden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

Ein präinkubiertes Gemisch aus poly[d(A-T)] und RNA-Polymerase wurde 15 Minuten bei 22 °C mit ATP und UTP (50 μM bzw. 5 μM) inkubiert. Das ATP war entweder in der α - oder in der γ -Position ^{32}P -markiert. Die Reaktionsprodukte wurden auf Acrylamidgelen getrennt.

a: $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP; kein Rifampicin

b: $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP; kein Rifampicin

c: $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP; 5 Minuten vor Substratzugabe wurde Rifampicin zum binären Komplex gegeben.

d: wie (c); statt $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP wurde $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP verwendet.

man statt $\alpha^{32}\text{P}$ -markiertem $\gamma^{32}\text{P}$ -markiertes ATP verwendet.

Damit ist sichergestellt, daß die entstandenen Oligonukleotide wirklich eine Adenosintriphosphatgruppierung an ihrem 5'-Ende tragen (Abb. 14).

2.2 Einfluß der Rifampicinkonzentration auf die Produkteverteilung

Trotz des hohen molaren Überschusses von Rifampicin über die RNA Polymerase könnte man behaupten, daß nur diejenigen Enzymmoleküle, von denen Rifampicin zwischenzeitlich dissoziiert ist, ein Dinukleosidtetraphosphat verlängern können, Enzymmoleküle dagegen, die das Antibiotikum gebunden haben, zu keiner Elongationsreaktion im Stande sind. In diesem Fall sollte dem $\text{Rif} \rightleftharpoons \text{Enzym}$ Assoziationsgleichgewicht entsprechend eine Steigerung der Rifampicinkonzentration zu einer Unterdrückung, mindestens aber zu einer Verringerung der Bildung von Tri- und höheren Oligonukleotiden führen. Das ist aber nicht der Fall, wie in Abb. 15 gezeigt ist: Wenn einmal der molare Äquivalenzpunkt von Rifampicin zu Polymerase überschritten ist, ergibt sich keine weitere Änderung in der Produkteverteilung.

2.3 Zum Mechanismus der Oligonukleotidentstehung in Gegenwart von Rifampicin

Für die Bildung von Oligonukleotiden in Gegenwart von Rifampicin müssen zwei mechanistische Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: Entweder könnte die Verlängerung des primär entstandenen pppApUs direkt, ohne eine vorherige Dissoziation vom aktiven Komplex erfolgen, was dem "normalen", d. h. Rifampicin freien Reaktionsablauf entspräche, oder aber für die Elongation des Dinukleotides

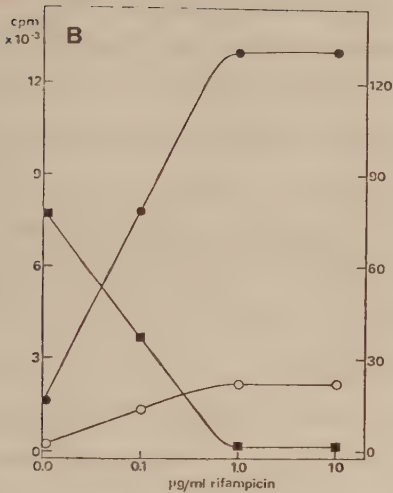


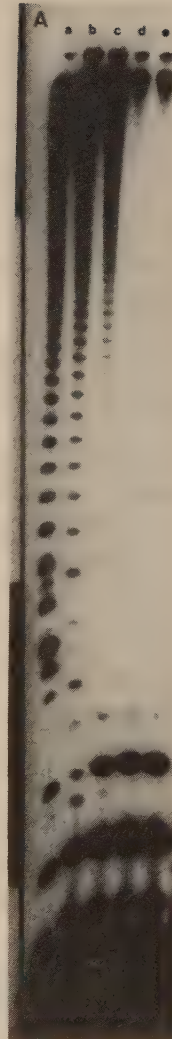
Abb. 15: Abhängigkeit der Oligonukleotidsynthese von der Rifampicin-Konzentration

10 µl-Reaktionsansätze mit poly[d(A-T)], Enzym und steigenden Mengen Rifampicin wurden 10 Minuten bei 22 °C inkubiert. Nach der Zugabe von ATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (50 µM bzw. 5 µM) wurde weitere 15 Minuten inkubiert.

A: Auftrennung der Produkte auf einem Acrylamidgel
 a: ohne Rifampicin, b: 0.01, c: 0.1, d: 1 und e: 10 µg/ml Rifampicin

B: Quantitative Bestimmung der Hauptreaktionsprodukte: ● : pppApU, ○ : pppApUpA, ■ : "RNA" (alle Produkte, die größer als das Tetranukleotid waren).

Der Maßstab an der rechten Seite gilt für "RNA", der an der linken für Di- und Trinukleotid.



Könnte auch die Dissoziation und Neubindung ein unabdingbare Voraussetzung sein. Vorstellbar wäre z. B. , daß auf diese

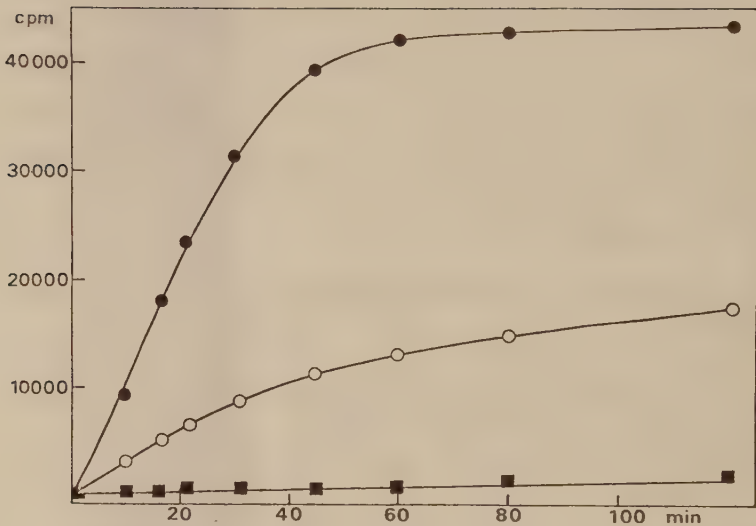


Abb. 16: Kinetik der Oligonukleotidsynthese in Gegenwart von Rifampicin

Zu einem Reaktionsansatz, in dem sich poly[d(A-T)], RNA-Polymerase und Rifampicin befanden, wurde nach 10 Minuten Inkubation ATP und α^{32} -UTP (50 bzw. 5 μ M) dazugegeben. 5 μ l-Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und gelelektrophoretisch analysiert. Die Menge von Di-, Tri- und Tetranukleotid wurde für jede entnommene Probe ermittelt.

● : pppApU, ○ : pppApUpA, ■ : pppApUpApU

Weise eine eventuelle Blockade des Translokationsschrittes durch das Antibiotikum überspielt werden könnte. Tatsächlich scheint die erste Möglichkeit realisiert zu sein. Ein erster Beweis dafür stammt aus der Kinetik der Di-, Tri- und

Tetranukleotidentstehung unter Rifampicin, die in Abb. 16 gezeigt ist. Während der ersten 30 min ist die Synthese aller drei Oligonukleotide linear. Für das Tri- bzw. Tetranukleotid wird keine Verzögerungsphase beobachtet. Das wäre aber zu erwarten, wenn vor ihrer Bildung zuerst einmal pppApU entstehen und freigesetzt werden müßte. In der späten Phase der Kinetik plattauert wegen des allmählichen Verbrauchs des UTPs die Produktion des Dinukleotides, während die des Trinukleotides weitergeht (ATP war im Überschuß vorhanden), was dafür spricht, daß nun das im Reaktionsgemisch akkumulierte pppApU verlängert wird. Einen direkteren Beweis liefert der in Abb. 17 gezeigte Isotopenaustauschversuch. Ein Reaktionsgemisch aus RNA Polymerase, poly[d(A-T)], Rifampicin, ATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP wurde zusammen mit steigenden Mengen von nichtmarkiertem pppApU inkubiert. Wenn das aus ATP und UTP gebildete Dinukleotid direkt verlängert werden würde, wäre das Verhältnis von radioaktivem Di- zu Trinukleotid konstant und unabhängig von der pppApU-Konzentration. Dieser Grenzfall ist im Diagramm durch die gepunktete horizontale Linie repräsentiert. Das Verhältnis Di- zu Trinukleotid würde aber schnell steigen, wenn Dissoziation und Rückbindung des Dinukleotids seiner Elongation in jedem Fall vorauszugehen hätte. Die gestrichelte Linie beschreibt diesen Fall, unter der Voraussetzung, daß sämtliches aus ATP und UTP gebildetes pppApU sofort mit dem nichtmarkierten pppApU austauscht. Kurve c gibt das experimentell ermittelte Verhältnis von Di- zu Trinukleotid wieder. Es steigt zunächst etwas an,

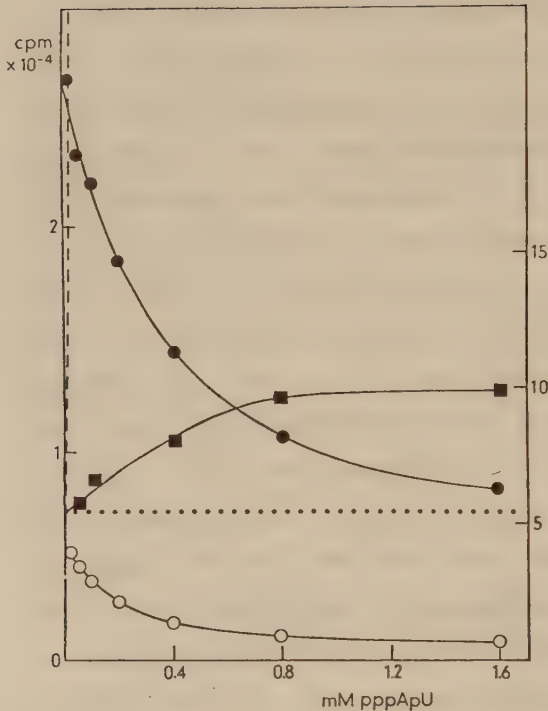


Abb. 17: Austausch zwischen pppApU, das sich im Verlauf der Reaktion bildet und pppApU, das zusätzlich in den Ansatz gegeben wird

10 μ l-Ansätze mit poly[d(A-T)], Enzym, Rifampicin und steigenden Mengen pppApU wurden mit ATP (50 μ M) und α^{32} P-UTP (5 μ M) versetzt und 15 Minuten bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte pppApU und pppApUpA wurden durch Acrylamidgelelektrophorese getrennt und quantitativ bestimmt.

- : berechnete Kurve für den Fall, daß alles entstandene pppApU sofort und vollständig mit exogenem austauscht.
-: kein Austausch (theoretische Linie)
- : gemessenes Verhältnis von Di- zu Trinukleotid
- : synthetisierte Menge von Dinukleotid
- : synthetisierte Menge von Trinukleotid

bleibt dann aber auch bei einer weiteren Erhöhung der pppApU-Konzentration konstant. Die einfachste Erklärung ist die, daß das entstehende markierte pppApU zwar austauschen kann, daß diese Möglichkeit aber nur auf die kurze Zeitspanne bis zur Verlängerung zum Trinukleotid beschränkt ist. Die Synthese von markiertem Di- und Trinukleotid nimmt erwartungsgemäß bei der Zugabe von pppApU ab (Kurve d und e), da es in der Initiationsreaktion mit dem ATP kompetiert.

2.4 Kinetik der Trinukleotidsynthese in An- und Abwesenheit von Rifampicin

Die Synthese von pppApUpA aus freiem pppApU und ATP ist in An- und Abwesenheit von Rifampicin möglich. Der zeitliche Verlauf der Trinukleotidentstehung ist in den beiden Fällen verschieden (Abb. 18). In Abwesenheit von Rifampicin lassen sich deutlich zwei Abschnitte unterscheiden: Im ersten erfolgt die Bildung von Trinukleotid schnell, während sich im zweiten die Trinukleotidmenge nur noch sehr langsam weiter erhöht. Die molare pppApUpA Konzentration in dieser Phase entspricht ungefähr der der RNA Polymerase (die Konzentrationsangaben sind allerdings mit einem großen Fehler behaftet, weil sich die spezifische Radioaktivität des ATPs nur ungenau bestimmen ließ). In Gegenwart von Rifampicin ist die Reaktionsgeschwindigkeit in der initialen Phase zwar niedriger, nimmt dafür aber im späteren Verlauf kaum ab. Dadurch entsteht schließlich sogar mehr pppApU in Anwesenheit des Inhibitors. Die niedrige Bildungsgeschwindigkeit in der späten Phase der Rifampicin freien Reaktion

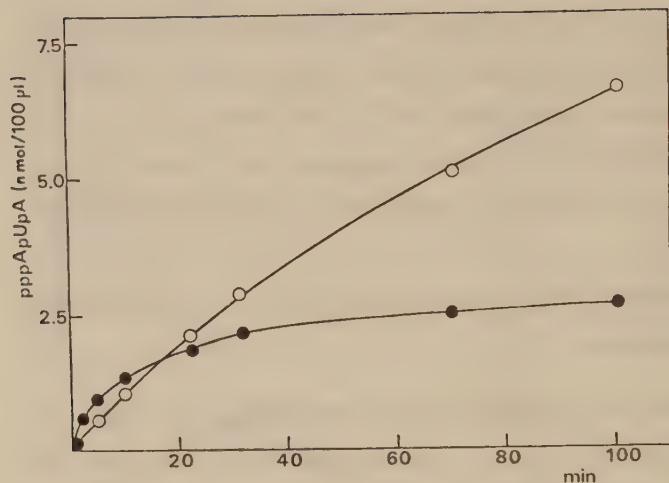


Abb. 18: Kinetik der pppApUpA-Bildung mit und ohne Rifampicin

Die Reaktion wurde durch Zugabe von pppApU und $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (50 μM) zu zwei präinkubierten Gemischen von poly[d(A-T)] und Enzym gestartet. Ein Ansatz enthielt zusätzlich Rifampicin. Zu den angegebenen Zeiten wurden 5 μl -Proben entnommen, mit "Stop-Puffer" gemischt und auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Das synthetisierte Trinukleotid wurde quantitativ bestimmt.

○ : mit Rifampicin, ● : ohne Rifampicin

spricht dafür, daß die Freisetzung des Produktes zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt geworden ist. Die produktionssteigernde Wirkung von Rifampicin könnte dann darin bestehen, daß die Dissoziation des Produktes vom aktiven Komplex beschleunigt wird und daß Enzym dadurch wieder frei für die Bindung von neuem Substrat wird.

2.5 Der Einfluß von Rifampicin auf die Stabilität von ternären Initiationskomplexen

Die verringerte Stabilität des ternären Komplexes mit Trinukleotid in Gegenwart von Rifampicin wird deutlich, wenn man versucht, den Komplex durch Chromatographie an Sepharose 4B zu isolieren. Das erwies sich als unmöglich. Sämtliches Trinukleotid erschien im Salzvolumen der Säule, war also nicht mehr an den Enzym-DNA-Komplex gebunden. Zu dem gleichen Ergebnis gelangt man, wenn man in Gegenwart von Rifampicin versucht, direkt aus den Komponenten poly[d(A-T)] Enzym und pppApUpA einen ternären Komplex zu bilden und zu isolieren. Auch hier hatte keine stabile Bindung des Trinukleotides an den binären Komplex stattgefunden.

Das Ausmaß der destabilisierenden Wirkung sollte sich am besten an einem isolierten ternären Komplex untersuchen lassen. In Abschnitt 3.1 wurde die Halbwertszeit des Initiationskomplexes bestimmt. Analoge Versuche (direkte Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit und Ermittlung der funktionell noch intakten Fraktion) wurden nun in Gegenwart von Rifampicin durchgeführt. Überraschenderweise zeigt das Antibiotikum aber überhaupt keinen Effekt. Damit benahm sich der Initiationskomplex genau wie ein Rifampicin resistenter ternärer Elongationskomplex mit hochmolekularer RNA. Offenbar kann das Antibiotikum nur dann an die RNA Polymerase binden, wenn sie in freier Form oder in einem binären Komplex mit der DNA vorliegt.

2.6 Die Unterdrückung der Rifampicinwirkung durch hohe Dinukleotidkonzentrationen

Beim Vergleich der Kinetiken (Abb. 18) wurde die Stimulation der Trinukleotidbildung durch Rifampicin mit dessen Einfluß auf die Freisetzung des Produktes erklärt. Dies gilt aber nur für die späte Phase der Reaktion, in der bereits alle Enzymmoleküle mit Produkt beladen sind. Im frühen Abschnitt hemmt Rifampicin dagegen die Synthese - vermutlich dadurch, daß es die Bindungsstabilität des Dinukleotides herabsetzt und so zu einer Konzentrationserniedrigung des komplexgebundenen pppApUs führt. Die stationäre Konzentration von gebundenem pppApU wird außer durch die Dissoziations- durch die Assoziationsgeschwindigkeit bestimmt. Deshalb sollte eine Erhöhung der pppApU Konzentration die Rifampicinwirkung aufheben oder mindestens abschwächen. Diese Erwartung wurde erfüllt. Abb. 19 zeigt die pppApU-Sättigungskurven für die Trinukleotidsynthese. Während bei Abwesenheit des Antibiotikums schon sehr kleine Konzentrationen des Dinukleotides für die maximale Trinukleotidsynthese genügten, waren in Gegenwart von Rifampicin erheblich höhere Mengen notwendig.

Eine weitere Erhöhung der pppApU Konzentration über den in der Abbildung gezeigten Wert hinaus brachte nicht nur keine Steigerung der pppApUpA Bildung, sondern führte aus noch unbekannten Gründen zu einer drastischen Reduktion, unabhängig davon, ob Rifampicin im Ansatz vorhanden war oder nicht.

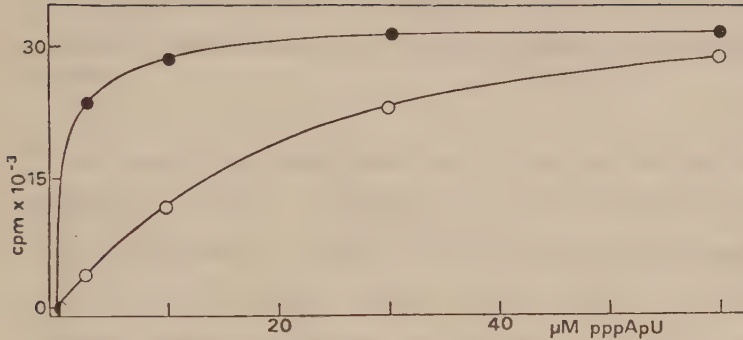


Abb. 19: pppApU-Sättigungskurven

$\alpha^{32}\text{P}$ -ATP ($5 \mu\text{M}$) und steigende Mengen pppApU wurden zu präinkubierten poly[d(A-T)]-Enzymmischungen, die zu einer Hälfte Rifampicin enthielten, dazugegeben. Die Inkubation wurde bei 22°C für 10 Minuten fortgesetzt. Die gebildete Trinukleotidmenge wurde nach Acrylamidgelelektrophorese bestimmt.

o: mit Rifampicin, ●: ohne Rifampicin

2.7 Die Wirkung von Rifampicin in Transkriptionssystemen mit natürlicher DNA

Zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit wurden die Gründe für die Wahl von poly[d(A-T)] als Matrize dargelegt. Natürlich war es aber von großem Interesse, festzustellen, ob die Hypothese über die Wirkungsweise von Rifampicin verallgemeinerbar ist. Eine detaillierte Analyse an einer natürlichen DNA war zwar nicht gut durchführbar, aber die Ergebnisse von zwei Experimenten in denen die DNA des Bakteriophagen T7-D111 (einer Deletionsmutanten des T7-Phagen; Studier, 1975), als Matrize benutzt wurde, deuten

darauf hin, daß die Hypothese über die Wirkungsweise von Rifampicin verallgemeinerbar ist. Es handelt sich 1. um ein Pyrophosphataustauschexperiment und 2. um den Nachweis der Trinukleosidpentaphosphat-Synthese in Gegenwart des Antibiotikums.

2.7.1 Einfluß von Rifampicin auf den Pyrophosphataustausch

Die T7-D111-DNA besitzt nur noch den ersten der drei A-Promotoren. Die Initiationssequenz seines Transkriptes ist pppApUpCpGpA... (Pribnow, 1975). Daher ist hier die Reaktion von ATP mit UTP auf die Bildung von pppApU beschränkt. Unter den gewählten Bedingungen wird die pppApU-Produktion durch die Anwesenheit von Rifampicin nicht wesentlich beeinflusst. Um so erstaunlicher war es daher, daß Rifampicin den Pyrophosphataustausch weitgehend verhindert (Abb. 20). Den Pyrophosphataustausch kann man als Rückreaktion der Dinukleotidbindung ansehen: $\text{pppA} + \text{pppU} \rightleftharpoons \text{pppApU} + \text{PP}$. Seine Geschwindigkeit ist bei konstanter Pyrophosphatkonzentration von der Dinukleotidkonzentration, genauer von der Konzentration des komplexgebundenen Dinukleotides, abhängig. Gerade die wird aber, nach der vorgeschlagenen Hypothese über den Mechanismus der Wirkung des Antibiotikums herabgesetzt.

2.7.2 Entstehung von Trinukleosidpentaphosphat in Gegenwart von Rifampicin

Entsprechend der Initiationssequenz des A1-Promotors kann sich das Trinukleotid pppApUpC aus ATP, UTP und CTP oder aus pppApU und CTP bilden. Dies geschieht nicht nur in

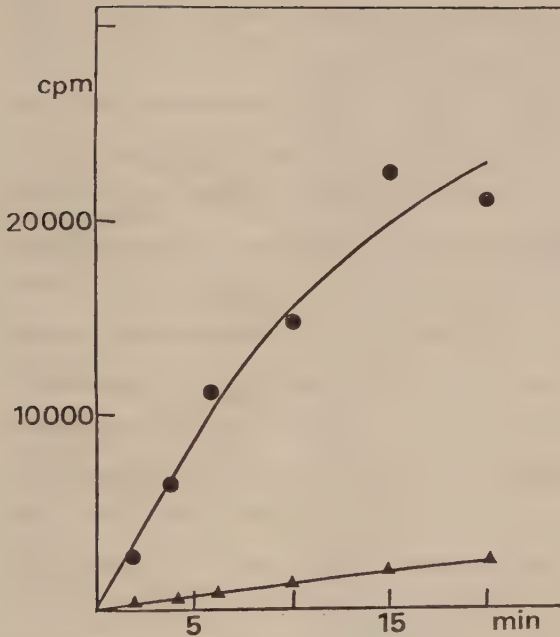


Abb. 20: Einfluß von Rifampicin auf den Pyrophosphataustausch

Zwei parallele 1 ml-Ansätze, von denen der eine neben 0.1 mg/ml T7-D111-DNA und 20 g/ml RNA-Polymerase zusätzlich 20 µg/ml Rifampicin enthielt, wurden 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von ATP, UTP (1 mM bzw. 0.5 mM) und ^{32}P -Pyrophosphat (0.2 mM) wurden zu den angegebenen Zeiten 100 µl-Proben entnommen. Die Menge von ausgetauschtem Pyrophosphat wurde bestimmt.

▲ : mit Rifampicin, ● : ohne Rifampicin

Abwesenheit von Rifampicin, sondern auch in seiner Gegenwart, wie das in Abb. 21 gezeigte Autoradiogramm eines Acrylamidgels beweist. Die beiden Pfeile deuten auf das Trinukleotid, das sich aus den Nukleosidtriphosphaten (Spur i) bzw. aus pppApU und CTP gebildet hat (Spur 1). Die

anderen Reaktionsansätze dienen der Identifizierung von pppApUpC oder sind Kontrollen. Der Vergleich der Ansätze b, c und d zeigt, daß unabhängig davon, welches der drei Nukleosidtriphosphate (ATP, UTP oder CTP) die radioaktive Markierung trägt, immer das gleiche Produkt in dem interessierenden Größenbereich auftaucht. Außer dem Dinukleotid pppApU und dem Trinukleotid pppApUpC werden in Gegenwart von Rifampicin zwei weitere Oligonukleotide überstoechiometrisch synthetisiert. Sie wandern im Gel jeweils etwas schneller als pppApU bzw. pppApUpC (Spur i und j). Wahrscheinlich handelt es sich um pppApC und pppApCpA, die am C Promotor entstehen können (die Initiationssequenz des C Promotors ist ACAG...; McConnell, 1979). Erhärten ließ sich diese Annahme dadurch, daß ein aus ATP und CTP synthetisiertes Dinukleotid durch Zugabe von ATP spezifisch zu einem Trinukleotid verlängert werden konnte, das im Acrylamidgel genau die gleiche Position hatte, wie das direkt aus ATP und CTP entstandene.

Wenn die T7 Promotoren und poly[d(A-T)] keine Ausnahme darstellen, läßt sich also verallgemeinernd feststellen, daß Rifampicin die "Transkriptionsreaktion" nicht auf die Bildung von Dinukleotid beschränkt, sondern auch die Entstehung höherer Oligonukleotide zuläßt.

Abb. 21: Produkte der T7-D111-DNA-abhängigen Oligonukleotidsynthese in Gegenwart und Abwesenheit von Rifampicin

Zu Ansätzen mit T7-D111-DNA und RNA-Polymerase und zum Teil mit Rifampicin wurden verschiedene Kombinationen von unmarkierten und ^{32}P -markierten

Nukleotiden gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 22 °C wurden die Reaktionsprodukte auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Die

Endkonzentrationen der Nukleotide waren: pppApU: 30 μM , ATP: 5 μM , UTP, CTP und GTP: 5 μM .

a: Referenzen (an poly[d(A-T)] synthetisiert)

b: $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, UTP, CTP, kein Rifampicin

c: ATP, $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP, CTP, kein Rifampicin

d: ATP, UTP, $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP, kein Rifampicin

e: $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, UTP, kein Rifampicin

f: $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, UTP, CTP, kein Rifampicin

g: $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, UTP, CTP, GTP, kein Rifampicin

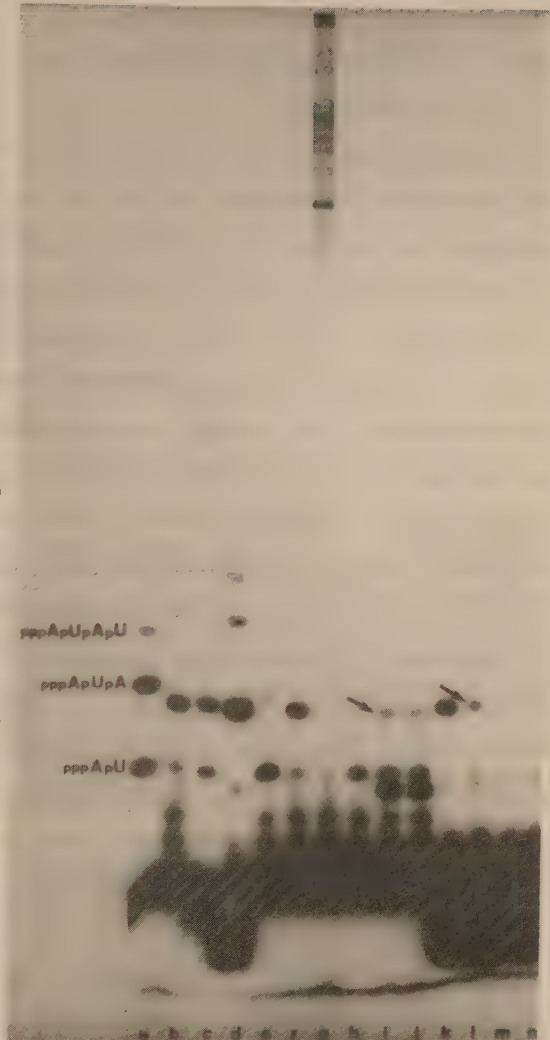
h: wie (e), mit Rifampicin

i: wie (f), mit Rifampicin

j: wie (g), mit Rifampicin

k: pppApU, $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP, kein Rifampicin

l: pppApU, $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP, mit Rifampicin m: pppApU, $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP, GTP, ohne Rifampicin n: pppApU, $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP, GTP, mit Rifampicin. Die Pfeile deuten auf das in Gegenwart von Rifampicin entstandene pppApUpC.



3. Die Reversibilität von Transkriptionsschritten

3.1 Die Bevorzugung von Adenosin am 3' terminalen Ende der RNA-Kette

Bei der Herstellung von ternären Initiationskomplexen aus $E\sigma$, poly[d(A-T)], pppApU, ATP und UTP ist es sehr auffällig gewesen, daß weitaus die meisten Oligonukleotide am 3'-Ende ein Adenosin hatten. Als einziges Oligonukleotid mit einem Uridin am Ende bildete sich in nennenswerter Menge nur das leicht dissoziierende Tetranukleotid pppApUpApU. Die Reaktionsansätze enthielten extrem niedrige Substratkonzentrationen ($0.1 \mu\text{M}$). Um auszuschließen, daß ein Verharren der Transkription im A-Raster durch diesen Umstand bedingt war, wurde ein ternärer Elongationskomplex, der durch Inkubation eines binären poly[d(A-T)]-Enzymkomplexes mit 1mM ATP und UTP hergestellt worden war, untersucht. Die Reaktion wurde eine halbe Minute nach Zugabe der Substrate zum binären Komplex durch schnelles Abkühlen auf 0°C gestoppt, und der ternäre Komplex wurde wie üblich durch Chromatographie an Sepharose 4B isoliert. Auch für diesen Komplex erwies sich eindeutig die Bevorzugung von Adenosin am 3'-Ende der RNA. Die Analyse konnte allerdings nicht auf die schon beschriebene Weise durchgeführt werden, weil eine gelelektrophoretische Unterscheidung von A- und U-endender RNA wegen ihres hohen Molekulargewichtes unmöglich war. Stattdessen wurde die Verlängerbarkeit des isolierten Komplexes um eine Nukleotideinheit untersucht. Dazu wurde

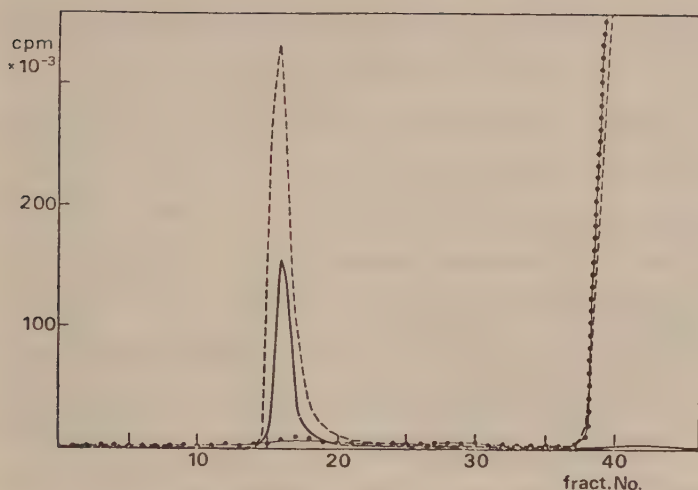


Abb.22: Bestimmung des Endnukleotides der naszierenden RNA im ternären Komplex

Ein Reaktionsansatz (Endvolumen: 200 μ l) mit binärem poly[d(A-T)]-Enzym-Komplex wurde nach Zugabe von ATP und UTP (beide 1 mM) 1/2 Minute weiter bei 22 °C inkubiert, dann schnell (im Eisbad) abgekühlt und auf eine Sepharose 4B-Säule aufgetragen. Der im Ausschlußvolumen isolierte ternäre Komplex wurde konzentriert (auf 200 μ l). Je 100 μ l wurden mit $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (5 μM) bzw. mit $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (5 μM) 5 Minuten bei 22 °C inkubiert und danach auf zwei Sepharose 4B-Säulen gegeben. Die Radioaktivität in den Fraktionen wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

—: Extinktion bei 260 nm, ...: Zugabe von $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP,
 ---: Zugabe von $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP

der isolierte Komplex alternativ mit nur einem Substrat, d.h. entweder mit $\alpha^{32}\text{P}$ ATP oder $\alpha^{32}\text{P}$ UTP, inkubiert und erneut auf eine Sepharose 4B-Säule gegeben. Während sich bei der Verwendung von ATP als Substrat (Abb. 22, Kurve a) so gut wie keine Radioaktivität im Ausschlußvolumen der Säule (ternärer Komplex) feststellen ließ, wurden erhebliche Mengen UMP in die RNA-Ketten eingebaut (Kurve b). Dieses Verhalten war nur möglich, wenn sich der ternäre Komplex

zuvor im A-Raster befunden hatte. ,

Allerdings hängt die Aussagekräftigkeit entscheidend von der Reinheit des verwendeten $\alpha^{32}\text{P}$ -UTPs ab. Spuren von ATP würden dafür sorgen, daß die Reaktion nicht auf die Addition eines einzigen UMPs beschränkt bliebe, sondern eine weitere RNA Synthese stattfinden würde. In dem Fall ließen sich aus der eingebauten Radioaktivitätsmenge keine Schlüsse mehr über die Anzahl A endender RNA-Ketten ziehen. Die Reinheit des verwendeten ^{32}P -UTPs konnte dadurch bewiesen werden, daß ein ternärer Komplex, der durch Inkubation mit nichtmarkiertem UTP in das U-Raster gebracht und erneut isoliert wurde, jetzt kein UMP mehr, sondern nur noch AMP einbaute.

3.2 Geschwindigkeit der Einzelschrittverlängerung

Die einfachste Erklärung für die unterschiedliche Verteilung zwischen A- und U- Raster ist die Annahme, daß die Elongation eines U-Komplexes wesentlich schneller abläuft als die eines A-Komplexes, daß die gesamte Folge der Elongationsschritte also nach dem Muster: schnell (Inkorporation eines AMPs), langsam (Inkorporation eines UMPs), schnell, langsam usw. erfolgt. Die Prüfung der Hypothese sollte direkt vorgenommen werden können, da es nämlich möglich war, ternäre Komplexe in beiden Rastern herzustellen. Abb. 23 zeigt die Kinetiken mit denen die A-Komplexe durch die Addition von UMP und die U-Komplexe durch die Addition von AMP in den jeweils anderen Typ umgewandelt werden. Obwohl sich der Fortschritt dieser

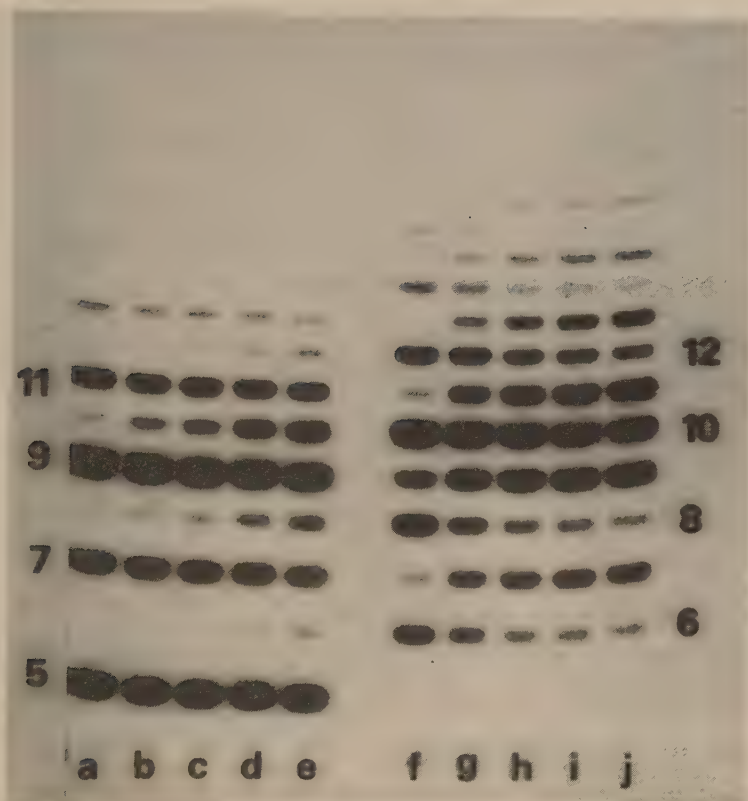


Abb. 23: Vergleich der Geschwindigkeiten der Einzelschrittverlängerung von A- bzw. U-Komplexen

Die aus poly[d(A-T)], RNA-Polymerase, ATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP gebildeten ternären Initiationskomplexe (im A-Raster) wurden isoliert (ohne anschließende Konzentrierung). Ein Teil wurde 5 Minuten mit $25\ \mu\text{M}$ UTP inkubiert und zur Isolierung der U-Komplexe erneut auf eine Sepharose 4B-Säule gegeben. Die A-Komplexe wurden durch Verdünnen mit Puffer auf die selbe Radioaktivität/Volumen wie die U-Komplexe gebracht. Verschiedene Zeiten nach Zugabe von UTP ($2 \times 10^{-7}\ \text{M}$) zu den A-Komplexen bzw. von ATP ($2 \times 10^{-7}\ \text{M}$) zu den U-Komplexen wurden Proben entnommen und auf einem Acrylamidgel analysiert.

a: A-Komplexe ohne Nukleosidtriphosphat, b-e: A-Komplexe plus UTP nach 1/4, 1/2, 3/4 und 1 Minute
f: U-Komplexe ohne Nukleosidtriphosphat, g-j: U-Komplexe plus ATP nach 1/4, 1/2, 3/4 und 1 Minute

Umwandlung infolge der niedrig gewählten Konzentrationen der Reaktionspartner (tern. Komplex ca. 10^{-8} M, ATP bzw. UTP 2×10^{-7} M) gut verfolgen ließ, war eine eindeutige Interpretation doch nicht möglich. Auf den ersten Blick scheint zwar AMP wirklich etwas schneller inkorporiert zu werden als UMP, aber die Differenz ist erstens zu klein, um eine Erklärung für die Bevorzugung des A-Rasters zu bieten und zweitens entsteht bei sorgfältiger Betrachtung der $U \rightarrow A$ Kinetik der Eindruck, daß A-Komplexe nicht nur durch einen Verlängerungsschritt, sondern zusätzlich auch durch einen Abbauschnitt aus den U-Komplexen entstehen können.

Diese Annahme ließ sich tatsächlich bestätigen. Wenn man nämlich U-Komplexe längere Zeit bei Raumtemperatur inkubiert, verwandeln sie sich mehr und mehr in die A-Komplexe (Abb. 24 g-k), während eine analoge Reaktion für die A-Komplexe nicht stattfand (Abb. 24, b-f). Bemerkenswert ist, daß die auf diese Weise gebildeten A-Komplexe funktionell vollständig intakt waren, d.h. ihr Oligonukleotid ließ sich durch Zugabe von UTP um eine Base und durch Zugabe von ATP und UTP zu hochmolekularer RNA verlängern.

3.3 Der pyrophosphorolytische Ausbau des 3'terminalen Nukleotides

Da die Einbauraten von AMP und UMP im wesentlichen gleich zu sein schienen, mußte nach einer alternativen Erklärung für das Überwiegen der A-Komplexe gesucht werden. Es ließ sich vermuten, daß die Gründe mit der leichten Umwandelbarkeit von U- in A-Komplexe zusammenhängen. Der Abbau der

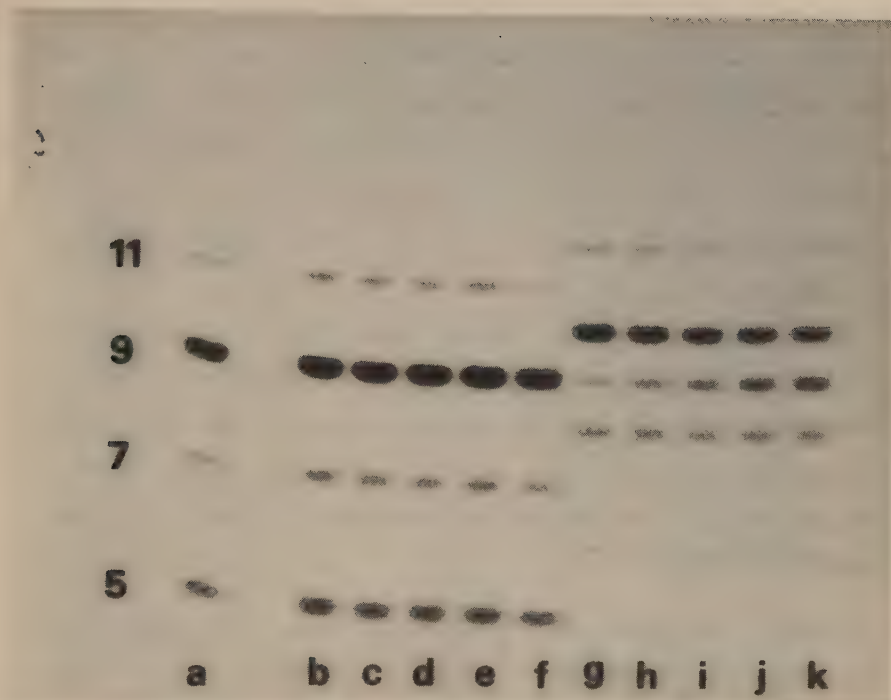


Abb. 24: Beständigkeit von A- bzw. U-Komplexen

Ternäre Initiationskomplexe im A- bzw. im U-Raster (vgl. Abb. 23) wurden bei 22 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und auf einem Acrylamidgel analysiert.

a: Referenz, b-f: A-Komplexe nach 0, 5, 12, 20, 40 Minuten
g-k: U-Komplexe nach 0, 5, 12, 20, 40 Minuten

U-Komplexe um ein Nukleotid könnte prinzipiell durch Hydrolyse oder Pyrophosphorolyse des 3' terminalen UMPs erfolgen. Da über eine hydrolytische Aktivität der RNA Polymerase nichts bekannt war, schien die Pyrophosphorolyse die wahrscheinlichere Möglichkeit zu sein. Allerdings ließ sich schwer verstehen, wo das dazu notwendige Pyrophosphat

herstammen sollte.*)

Als Produkte der beiden alternativen Abbaureaktionen sind UMP bzw. UTP zu erwarten. Um zu entscheiden, welches Produkt entsteht, wurden isolierte und konzentrierte A-Komplexe mit $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP inkubiert und die entstandenen U-Komplexe erneut isoliert. Diese waren ausschließlich im 3' terminalen UMP markiert.

Wie in Abb. 25 gezeigt, bildet sich aus den Komplexen UTP, d.h. es findet eine langsame Pyrophosphorolyse statt. Sehr viel schneller erfolgte die Freisetzung von UTP nach Zugabe von 0.1 mM Pyrophosphat (Abb. 25, Spur g-k). Spätestens nach zwei Minuten war sämtliches endständige UMP ausgebaut worden.

Anders reagieren die A-Komplexe. Abb. 26 zeigt das Verhalten von Komplexen, deren endständiges AMP die radioaktive Markierung trägt (Herstellung: siehe Material & Methoden). Bei der Inkubation ohne zugesetztes Pyrophosphat passierte überhaupt nichts (Spur b-e) und auch bei der Zugabe von Pyrophosphat ist nur ein langsamer Ausbau von AMP

*) Wie spätere Experimente zeigten, wurden wahrscheinlich Spuren von Pyrophosphat bei der chromatographischen Isolierung des Komplexes verschleppt. Jedenfalls konnte man ganz saubere U-Komplexe (fast kein A-Oligonukleotid) erhalten, wenn man sie nach ihrer ersten Reinigung noch einmal mit UTP inkubierte und dann erneut chromatographierte (vergl. auch Abb. 28, Spur a).

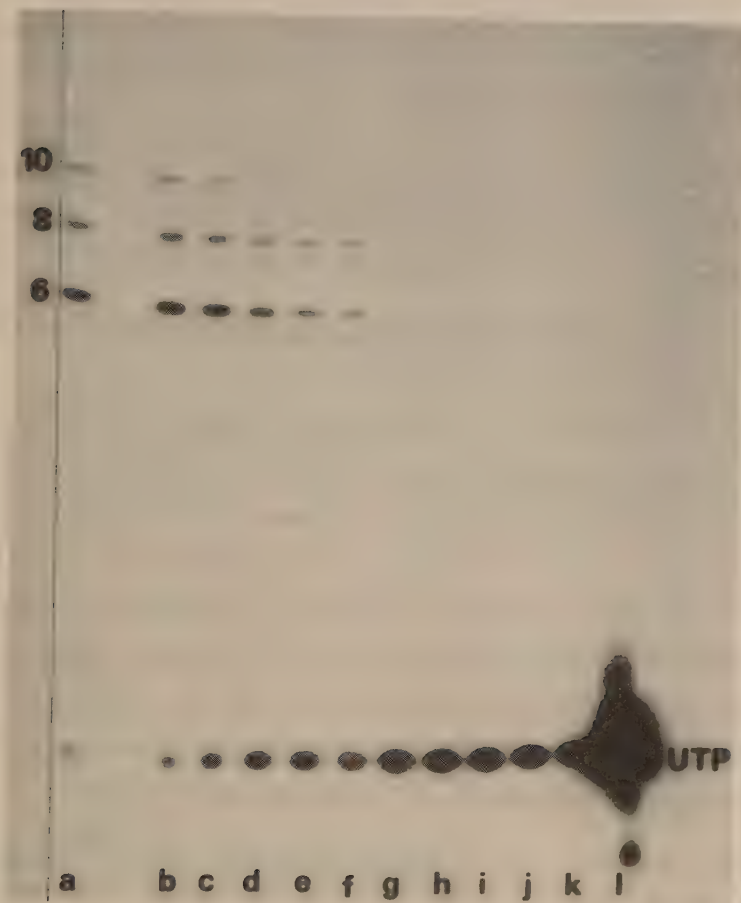


Abb. 25: Pyrophosphorolytischer Ausbau des 3'-terminalen UMPs

Zwei Reaktionsansätze mit isolierten U-Komplexen, bei denen nur das 3'-terminale UMP markiert war, wurden bei 22 °C inkubiert. Zu einem der Ansätze wurden 0.1 mM Pyrophosphat gegeben. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und gelelektrophoretisch untersucht.

a: Referenz, b-f: 2, 5, 10, 20, 40 Minuten Inkubation ohne Pyrophosphat g-k: 2, 5, 10, 20, 40 Minuten mit Pyrophosphat
l: UTP

zu beobachten (Spur f-1). Diese unterschiedlichen Raten in der Pyrophosphorolyse des 3' terminalen Nukleotides von ternären Komplexen bietet eine Erklärung für die gefundene A/U-Raster-Verteilung. Demnach werden AMP und UMP zwar etwa gleich schnell in die RNA Kette eingebaut, aber während die entstandenen A-Komplexe bestehen bleiben, werden die U-Komplexe durch endogenes Pyrophosphat schnell wieder zerstört.

3.4 Pyrophosphorolyse und Pyrophosphataustausch unter Synthesebedingungen

Aus den bisherigen Untersuchungen ergab sich kein Hinweis, daß Pyrophosphat unter normalen Synthesebedingungen einen Effekt ausübt. Wie jedoch aus Abb. 27 zu entnehmen ist, läßt sich die Einbaurrate von Nukleotiden in die naszierende RNA eines ternären Komplexes steigern, wenn man das entstehende Pyrophosphat beseitigt. Im Prinzip gäbe es hierfür zwar verschiedene Erklärungen, aber am wahrscheinlichsten ist es doch, daß das entstehende Pyrophosphat eine der Synthese entgegengesetzte Pyrophosphorolyse bewirkt.

Eine Methode, die Pyrophosphorolyse auch unter Synthesebedingungen verfolgen zu können, besteht in der Messung des Pyrophosphataustausches, denn dieser kann als eine sich mehrfach wiederholende Folge von Ein- und Ausbaureaktionen eines Nukleotides in die RNA-Kette angesehen werden.

Gibt man zu dem in Abb. 27 a beschriebenen Reaktionsansatz (tern. Elongationskomplex, ATP (1 mM) und UTP (1 mM))

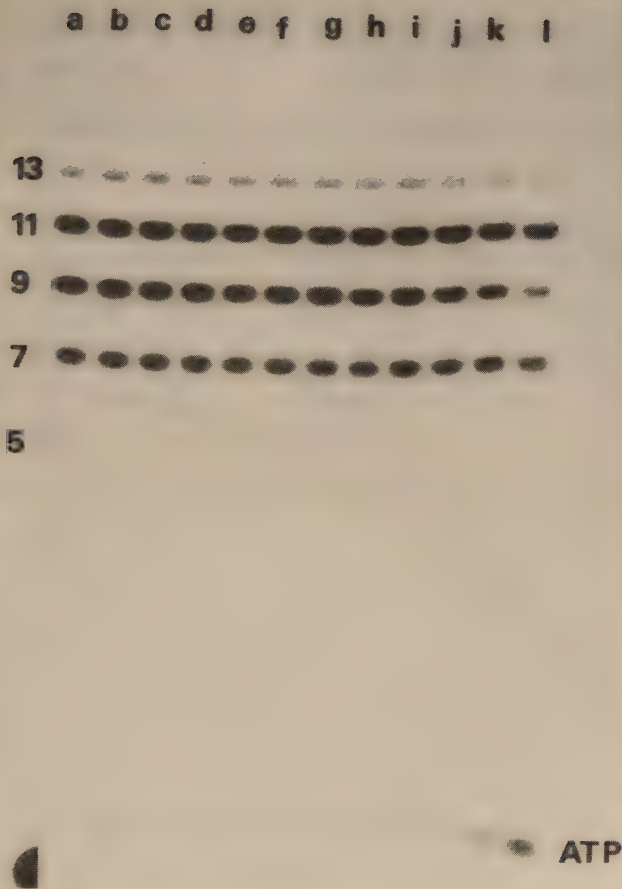


Abb. 26: Pyrophosphorolytischer Ausbau des 3'-terminalen AMPs

Isolierte A-Komplexe, bei denen nur das 3'-terminale AMP radioaktiv markiert war, wurden, wie für die entsprechenden U-Komplexe in Abb. 25 beschrieben, mit und ohne Pyrophosphat (0.1 mM) bei 22 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und gelelektrophoretisch untersucht.

a: isolierte ternäre Komplexe

b-e: 2, 5, 10, 20 Minuten ohne Pyrophosphat

f-l: 1/4, 1/2, 1, 2, 5, 10, 20 Minuten Inkubation mit Pyrophosphat

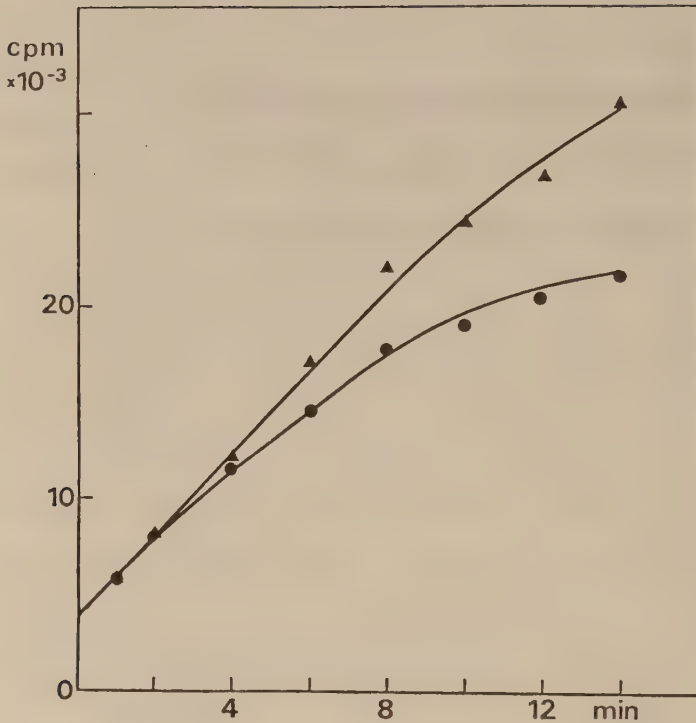


Abb. 27: Einfluß von endogenem Pyrophosphat auf die Transkriptionsgeschwindigkeit

Ein ternärer Komplex aus poly[d(A-T)], Enzym und poly[r(A-U)] wurde, wie in Abb. 22 beschrieben, hergestellt und isoliert. Die Ionenstärke der Lösung mit dem isolierten Komplex wurde durch Zugabe von KCl (0.25 M) erhöht. Die Verlängerung der RNA nach Zugabe von ^{14}C -ATP (1 mM; 1 Ci/Mol) und UTP (1 mM) wurde in Gegenwart und Abwesenheit von Anorganischer-Pyrophosphatase (4 Units/ml) verfolgt. Dazu wurden zu verschiedenen Zeiten 100 μl -Proben entnommen und mit 5% Trichloressigsäure behandelt. Die Säure-präzipitierbare Radioaktivität wurde bestimmt.

● : ohne Pyrophosphatase, ▲ : mit Anorganischer Pyrophosphatase

^{32}P -Pyrophosphat (0.2 mM und ca. 100 Ci/Mol) dazu, so kann man einen Pyrophosphataustausch sowohl in das ATP als auch in das UTP nachweisen. Das Verhältnis von ^{32}P UTP zu ^{32}P ATP betrug ca. 5.5, wenn die Proben 5 Minuten nach dem Zusammenmischen aller Komponenten entnommen worden waren. Während dieser Zeitspanne verlief die Elongation der tern. Komplexe nahezu linear. Die großen Unterschiede beim Pyrophosphataustausch ins UTP bzw. ATP im poly[d(A-T)] System waren schon 1969 von Krakow und Fronk, wenn auch unter weniger definierten Bedingungen, beobachtet worden. Das von ihnen aus diesen Befunden entwickelte Modell wird später ausführlicher diskutiert.

Einen direkten und illustrativen Eindruck über die Situation beim Pyrophosphataustausch gibt die Abb. 28. Während die alleinige Zugabe von Pyrophosphat zu isolierten ternären Komplexen im U-Raster zu einer sehr schnellen Umwandlung der Komplexe führte, sorgte die gleichzeitige Verabreichung von UTP für die teilweise Erhaltung bzw. Wiederherstellung der U-Komplexe.

3.5 Pyrophosphorolyse von RNA

Die Transkription wird in der Literatur als ein irreversibler Prozess beschrieben und unter Synthesebedingungen läßt sich auch kein pyrophosphorolytischer Abbau einer einmal synthetisierten RNA nachweisen. Andererseits entstand bei den Untersuchungen über den Ausbau des endständigen

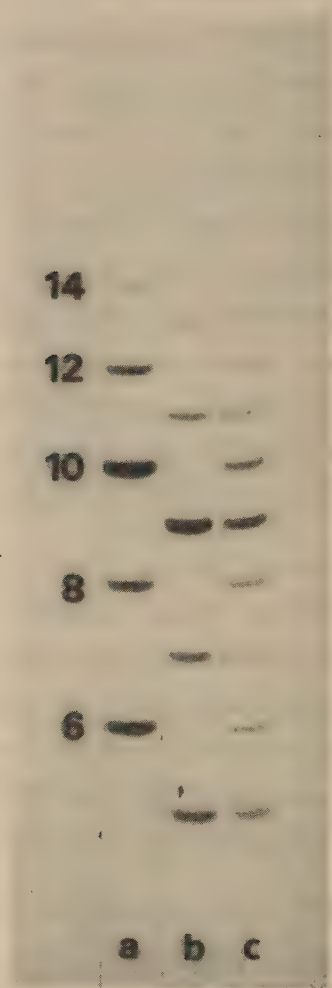


Abb. 28: Illustration des Pyrophosphataustausches

Isolierte ternäre Initiationskomplexe im U-Raster wurden entweder 1/2 Minute bei 22 °C mit Pyrophosphat (50 μ M) allein oder mit einer Mischung aus Pyrophosphat und UTP (10 μ M) behandelt. Die Reaktionen wurden durch Gelelektrophorese verfolgt.

a: isolierte ternäre Komplexe im U-Raster

b: Zugabe von Pyrophosphat

c: Zugabe von Pyrophosphat und UTP

Nukleotids der Verdacht, daß die Pyrophosphorolyse doch nicht auf das letzte Nukleotid in der RNA-Kette beschränkt ist.

Zur Klärung dieser Frage wurden ternäre Elongationskomplexe

Abb. 29: Pyrophosphorolyse eines ternären Komplexes

Ternäre Initiationskomplexe, die aus poly[d(A-T)], RNA-Polymerase, pppApU, ATP und $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP hergestellt und isoliert wurden, wurden mit 1 mM Pyrophosphat versetzt und bei 22 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und auf ein Acrylamidgel aufgetragen.

a: Referenzen

b: Reaktionsgemisch vor Pyrophosphatzugabe

c-h: 7, 17, 35, 48, 66 und 90 Minuten nach Pyrophosphatzugabe



isoliert und mit Pyrophosphat inkubiert. Da sie in den UMPs ihrer Oligonukleotide radioaktiv markiert waren, ließen sich UTP-Entstehung und die Veränderungen im Oligonukleotidmuster verfolgen. Abb. 29 gibt einen Eindruck vom Ausmaß und zeitlichen Verlauf der Reaktion. Ganz deutlich akkumulierte UTP. Schon diese Tatsache allein beweist, daß die RNA in ternären Komplexen durch Pyrophosphat abgebaut werden kann, da das markierte Nukleotid nicht das 3'-terminale der

RNA-Kette ist (die isolierten Komplexe befanden sich alle im A-Raster!). Noch überzeugender sind aber die korrespondierenden Verkürzungen der Oligonukleotide. Auffällig ist auch hier wieder, daß kein U-Komplexe, sondern nur Komplexe im A-Raster auftauchen, womit die oben geäußerte Hypothese über die unterschiedlichen Ausbauraten von AMP und UMP nochmals bestätigt wird.

Bei der Pyrophosphorolysereaktion handelt es sich um einen fundamentalen Prozess, der nicht auf das poly[d(A-T)] System beschränkt sein sollte. Mit einem einfachen Versuch ließ sich die Pyrophosphorolyse dementsprechend auch bei der Verwendung von T7-D111-DNA als Matrize nachweisen. In Abb.30 ist der zeitliche Verlauf der Pyrophosphorolyse eines isolierten ternären Elongationskomplexes gezeigt. Seine RNA war durch den Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -AMP markiert worden. Die Proben aus dem Reaktionsgemisch wurden auf PEI-Dünnschichtplatten analysiert. Die am Start liegengebliebene hochmolekulare RNA (Abb.30 A) wurde ausgeschnitten und quantitativ bestimmt (Abb.30 B).

A

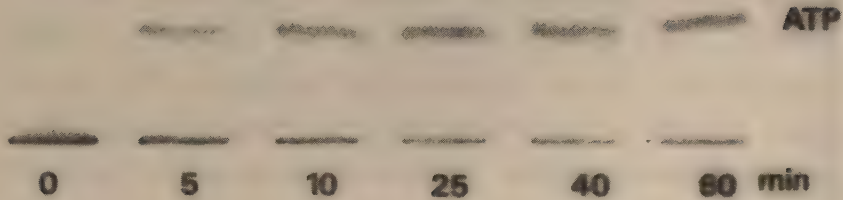
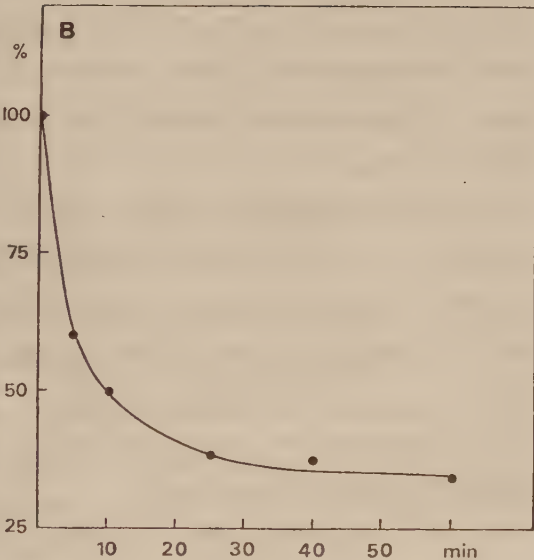


Abb. 30: Pyrophosphorolyse eines ternären Komplexes mit T7-DNA als Matriz

Ein Gemisch aus T7-DNA (0.1 mg/ml) und RNA-Polymerase (20 μ g/ml) wurde 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. 1/2 Minute nach Substratzugabe (pppApU: 100 μ M, α^{32} P-ATP: 10 μ M, GTP, CTP und UTP: 10 μ M) wurde der Reaktionsansatz (200 μ l) schnell im Eisbad abgekühlt und auf eine Sepharose 4B-Säule aufgetragen. Die Fraktionen mit dem ternären Komplex wurden vereinigt und auf 200 μ l konzentriert. Der ternäre Komplex wurde bei 37 °C zusammen mit 1 mM Pyrophosphat inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 10 μ l-Proben entnommen und auf PEI-Dünnschichtplatten aufgetragen. Das Chromatogramm wurde in 0.15 M Phosphatpuffer entwickelt. Der Prozentsatz nicht-pyrophosphorolyzierter RNA wurde durch Messung der Radioaktivität an der Startlinie bestimmt.

A: Autoradiogramm des Dünnschichtchromatogramms,
B: Quantitative Auswertung

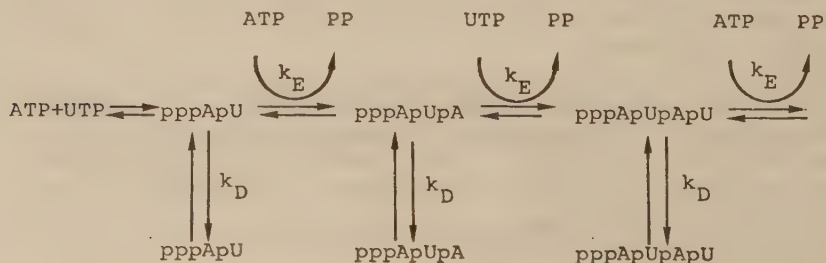


D DISKUSSION

Die Stabilität von Initiationskomplexen

Die Transkription der DNA durch die RNA-Polymerase läßt sich in vier individuelle Prozesse unterteilen: a) die selektive und spezifische Bindung des Enzyms an den Promotor, b) die Initiation einer RNA-Kette, c) ihre Elongation und d) die Termination der RNA-Synthese. Die Initiationsreaktion setzt sich aus einer ganzen Folge von Elementarschritten zusammen. Beginnend mit der Bindung und Verknüpfung der beiden ersten Nukleosidtriphosphate mündet die Initiation schließlich in die Elongationsphase ein, die dadurch charakterisiert ist, daß die abortive Produktion kurzer Oligonukleotide aufhört und die ternären Komplexe stabil werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die schrittweise Überführung eines binären Enzym-DNA-Komplexes in einen ternären Elongationskomplex untersucht. Aus Gründen der Überschaubarkeit und der guten Handhabbarkeit wurden die Arbeiten im poly[d(A-T)]-System durchgeführt. Die Initiationsreaktion läßt sich hier mit dem folgenden einfachen Schema beschreiben:



ATP und UTP werden unter Abspaltung von Pyrophosphat zum Dinukleosiddiphosphat verknüpft. Dieses kann prinzipiell entweder vom aktiven Komplex (durch eckige Klammern symbolisiert) dissoziieren, oder zum Trinukleotid verlängert werden. Für das Trinukleotid und die höheren Oligonukleotide besteht ebenfalls wieder die Alternative zwischen Dissoziation und Elongation. Im Schema ist die Möglichkeit angedeutet, daß freies Di-, Tri- und Tetranukleotid in einer der Dissoziation entgegengesetzten Reaktion spezifisch an den binären poly[d(A-T)]-Enzym-Komplex binden können. Die beobachtete Verlängerbarkeit der Oligonukleotide um jeweils einen Nukleotidrest zeigt, daß sie tatsächlich in einer produktiven Form gebunden werden. Die Ununterscheidbarkeit eines ternären Trinukleotidkomplexes, der sich direkt aus den Komponenten gebildet hatte, von einem, der durch Verlängerung des Dinukleotids entstanden war, macht noch deutlicher, daß die Bindung spezifisch erfolgt.

Durch die Dissoziation eines Oligonukleotides ist die abortive Initiation und durch die ununterbrochene Elongation die produktive Initiation gekennzeichnet. Das Verhältnis der individuellen Geschwindigkeitskonstanten k_E für die Elongation und k_D für die Dissoziation ist für das Ausmaß der abortiven Initiation maßgeblich.

Die isolierten ternären Initiationskomplexe boten die Möglichkeit, die Dissoziation der kurzen Produkte gesondert von allen anderen Reaktionsschritten zu untersuchen. Tendentiell steigt die Stabilität der Komplexe mit zunehmen-

der Länge ihrer RNA. Das spricht gegen die Überlegungen von Hansen und McClure (1980,a), daß der Übergang in einen stabilen Elongationskomplex ein diskretes Ereignis darstellt, daß mit der Dissoziation des σ -Faktors einhergeht. Eher scheint die Auffassung von Gralla et al. (1980) zuzutreffen, nach der die Verlängerung der RNA zu einer allmählichen Steigerung der Komplexstabilität führt.

Allerdings hat sich herausgestellt, daß die Festigkeit der Bindung nicht einfach mit der Länge des Oligonukleotides wächst. Vielmehr haben die Komplexe, deren Oligonukleotide am 3'-terminalen Ende ein Adenosin tragen, eine deutlich höhere Stabilität als die mit einem Uridin am Ende. Der Einfluß der Nukleotidsequenz geht sogar soweit, daß das Tetranukleotid wesentlich schwächer als das Trinukleotid und das Hexanukleotid schwächer als das Pentanukleotid gebunden ist.

Die höhere Stabilität von A-Komplexen ließ sich indirekt schon aus den Befunden früherer Arbeiten schließen (So und Downey, 1970; Oen und Wu, 1978). Direkt konnten Sylvester und Cashel (1980) zeigen, daß ein ternärer Komplex mit dem Trinukleotid ApUpA eine viel höhere Stabilität hat, als einer mit UpApU. Hier konnte man allerdings noch einwenden, daß das verlängerte Dinukleotid UpA vom Enzym nur als "ATP-Ersatz" angesehen wurde, daß also das 5'-terminale Pyrimidin keinen Beitrag zur Bindung an das Enzym beisteuerte. Die Bindung des entstandenen Trinukleotides UpApU entspräche dann eher der des Purin-Pyrimidin-Dinukleotides pApU. Diese Erklärungsmöglichkeit läßt sich aber

angesichts der Destabilisierung, die ein ternärer Komplex mit festgebundenem pppApUpA durch die Addition eines UMPs erfährt, nicht aufrechterhalten.

Bei den letzten Ausführungen mag der Eindruck entstanden sein, daß die Natur der 3'-terminalen Base den entscheidenden Einfluß auf die Bindung der kurzen Produkte ausübt. Das läßt sich aus den experimentellen Daten jedoch nicht ableiten. Z.B. könnte man behaupten, daß nicht das letzte Nukleotid, sondern das vorletzte von Bedeutung sei. Eine ganz andere Erklärungsmöglichkeit berücksichtigt den streng alternierenden Charakter der verwendeten Matrize. Durch ihn enden automatisch alle geradzahigen Glieder der naszierenden RNA-Kette mit einem Uridin- und alle ungeradzahigen mit einem Adenosinnukleotid. Wenn nämlich das Enzym, einem Modell von D.Dennis (1981) entsprechend, zwei Bindungsorte A und B besäße, die sich in ihrer Funktion als Substrat- bzw. Produktbindungsstelle periodisch abwechseln, ohne allerdings identisch in ihrer Affinität für die wachsende RNA zu sein, ergäbe sich zwangsläufig eine Korrelation zwischen Gerad- bzw. Ungeradzahigkeit der RNA-Kette und Komplexstabilität, wenn das Initiationsnukleosidtriphosphat außerdem eine Bindungsstelle deutlich bevorzugen würde. Eine Entscheidung darüber, ob der Charakter des endständigen Nukleotidrestes oder andere Parameter die Komplexstabilität beeinflussen, ließe sich durch vergleichende Experimente an verschiedenen Matrizen fällen. Erste Versuche, mit T7-D111- und T7-Wildtyp-DNA verliefen unbefriedigend (Experimente nicht gezeigt).

Verantwortlich dafür waren technische Schwierigkeiten, die hauptsächlich mit den niedrigen Promotorkonzentrationen und dem Auftauchen unerwarteter Produkte zusammenhingen.

In dem oben zur Beschreibung der Initiationsreaktion aufgestellten Schema ist die Dissoziation eines Oligonukleotides vom aktiven Komplex durch die Geschwindigkeitskonstante k_D und seine Elongation durch k_E charakterisiert. k_D und k_E sollten jedoch nicht als Konstanten im wörtlichen Sinne aufgefaßt werden. Vielmehr scheinen sie selbst durch die Konzentration von Nukleosidtriphosphaten verändert zu werden. So zeigen Untersuchungen von Shimamoto und Wu (1980,a; 1980,b und 1981), daß das dritte und vierte Nukleosidtriphosphat das Verhältnis von k_D zu k_E zugunsten der Elongation verschiebt. Die Beobachtung, daß die Zugabe von CMP oder GTP zu einem T7-D111 dirigierten pppApU-Syntheseansatz zu einer erheblichen Verringerung der Dinukleosidtetraphosphat-Synthese führt (Kessler, C. (1980) und Kessler et al. (1982)), läßt sich ebenfalls darauf zurückführen, daß die Bindung des Produktes an den aktiven Komplex stabilisiert wird und dadurch dessen abortive Produktion vermindert wird.

Einen gegenteiligen, d.h. destabilisierenden Effekt hat das Antibiotikum Rifampicin, dessen Wirkungsweise im zweiten experimentellen Abschnitt untersucht wurde.

Zur Wirkungsweise von Rifampicin

Im Einzelnen wurde gezeigt, daß ein binärer Enzym-DNA-Komplex in Gegenwart von Rifampicin nicht nur Dinukleosid-

tetraphosphat, sondern auch höhere Oligonukleotide synthetisieren kann. Ihre relative Menge nahm aber schnell mit zunehmender Länge ab, wenn die Reaktionsdauer so gewählt wurde, daß sich keine als Initiationsstarter dienenden Oligonukleotide im Reaktionsgemisch akkumulierten. Die einfachste Vorstellung, die in Übereinstimmung mit allen experimentellen Befunden steht, nimmt an, daß Rifampicin die Bindung der Oligonukleotide an den aktiven Komplex lockert, d.h. die Dissoziationskonstanten k_D erhöht, am Reaktionsablauf der Initiation prinzipiell aber nichts ändert. Wenn die Dissoziationsrate eines Oligonukleotides allgemein erhöht wird, reduziert sich damit automatisch die Wahrscheinlichkeit für seine Elongation. Direkt war der destabilisierende Effekt zwar nur für den Trinukleotid-Komplex gezeigt worden, aber sowohl das Pyrophosphataustauschexperiment am Al-Promotor von T7-D111, als auch die Möglichkeit, den Einfluß von Rifampicin auf die Trinukleotidsynthese durch hohe Konzentrationen von pppApU zu kompensieren, beweisen, daß das Antibiotikum die stationäre Konzentration von Dinukleotid im aktiven Komplex reduziert. Diese Vorstellung vom Wirkungsmechanismus des Antibiotikums steht im Widerspruch zu einer kürzlich von McClure und Cech (1978) veröffentlichten Hypothese, die annimmt, daß die Bindung des Rifampicins die Translokation und damit die Elongation des Dinukleosiddetraphosphates durch eine totale sterische Behinderung unmöglich macht. McClure und Cech begründeten ihr Modell in der Hauptsache mit den negativen Ergebnissen beim Nachweis von Trinukleotid oder höheren Oligonukleoti-

den. Mit dem Nachweis der Trinukleotidsynthese in Gegenwart von Rifampicin ist dem McClure'schen Vorschlag das wichtigste Argument entzogen. Sogar wenn man die Synthese höherer Oligonukleotide bei Verwendung von poly[d(A-T)] oder bei Verwendung des Lac UV 5-Promotors (Carpousis und Gralla, 1980) noch als "Sonderfall" ansehen wollte, ließe sich die Bildung von Trinukleotid mit T7-DNA als Matrize mit dem McClure'schen Modell nur schwer erklären.

Die Bindung von Rifampicin kann außer an das freie auch noch an das Enzym in einem binären Komplex erfolgen (Wehrli et al., 1968; di Mauro et al., 1969). Ein ternärer Elongationskomplex dagegen ist nicht nur funktionell indifferent gegenüber dem Inhibitor (Sippel und Hartmann, 1968; So und Downey, 1970), sondern kann ihn auch nicht mehr binden (Eilen und Krakow (1973) und Lill und Hartmann (1973)). Nicht nur der Elongationskomplex mit hochmolekularer RNA, sondern schon der ternäre Komplex mit dem Trinukleotid, erwies sich als gänzlich indifferent gegen das Antibiotikum.

Untersuchungen von Kessler (1980) und die neueste Veröffentlichung von Kessler et al. (1982) zeigen, daß eine an das Enzym gebundene RNA die Bindung von Rifampicin behindert und umgekehrt, daß gebundenes Rifampicin keine RNA-Bindung mehr zuläßt. Allerdings ist die Bindung von Oligonukleotid und Rifampicin im strengen Sinne nicht wechselseitig ausgeschlossen. Zwar schützt das Trinukleotid total vor Rifampicin, aber die RNA-Polymerase-Moleküle, die bereits den Inhibitor gebunden haben, sind in der Lage, Tetranukleotid

zu synthetisieren, wozu ja schließlich ein intermediär gebundenes Trinukleotid eine Voraussetzung ist.

Als eine wichtige Konsequenz der sofortigen Resistenzentstehung beim Übergang vom binären in den ternären Komplex muß die Bildung der kleinen Menge hochmolekularer RNA in Gegenwart von Rifampicin erwähnt werden: Alle diejenigen ternären Initiationskomplexe nämlich, von denen Rifampicin einmal abdissoziiert ist, können ungehindert hochmolekulare RNA synthetisieren, weil das Antibiotikum an sie nicht mehr rückzubinden vermag.

Die Reversibilität der Transkription

Im dritten Abschnitt des Ergebnisteils wurde gezeigt, daß die Transkriptionsreaktion reversibel ist. Die RNA in einem ternären Komplex läßt sich pyrophosphorolysieren. Als niedermolekulare Reaktionsprodukte entstehen die entsprechenden Nukleosidtriphosphate. Bemerkenswert war die extrem unterschiedliche Empfindlichkeit der ...ApU- bzw. der ...UpA-Bindung gegen einen pyrophosphorolytischen Angriff. Der schnelle Ausbau des endständigen UMPs und die geringen dazu benötigten Konzentrationen von Pyrophosphat erklären, warum sich die gestoppten oder isolierten ternären Komplexe fast ausschließlich im A-Raster befanden. Ebenso verständlich wird die beobachtete Hemmung der Elongationsreaktion durch endogenes Pyrophosphat, da mit der Verlängerung eines U-Komplexes um einen AMP-Rest der pyrophosphorolytische Ausbau des letzten UMPs konkurriert.

Einen viel leichteren Ausbau des endständigen UMPs folgerten schon Krakow und Fronk (1969) aus Pyrophosphataustauschexperimenten. Zur Erklärung ihrer Befunde entwickelten sie ein Modell des Elongationsprozesses. Da sich dieses Modell für die Erörterung einiger Aspekte der vorliegenden Arbeit eignet, soll es in den Grundzügen wiedergegeben werden. Allerdings sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß auch prinzipiell andere Modelle, z.B. das früher genannte D. Dennis-Modell, mit entsprechenden Veränderungen diskutabel wären.

Das Krakow-Modell

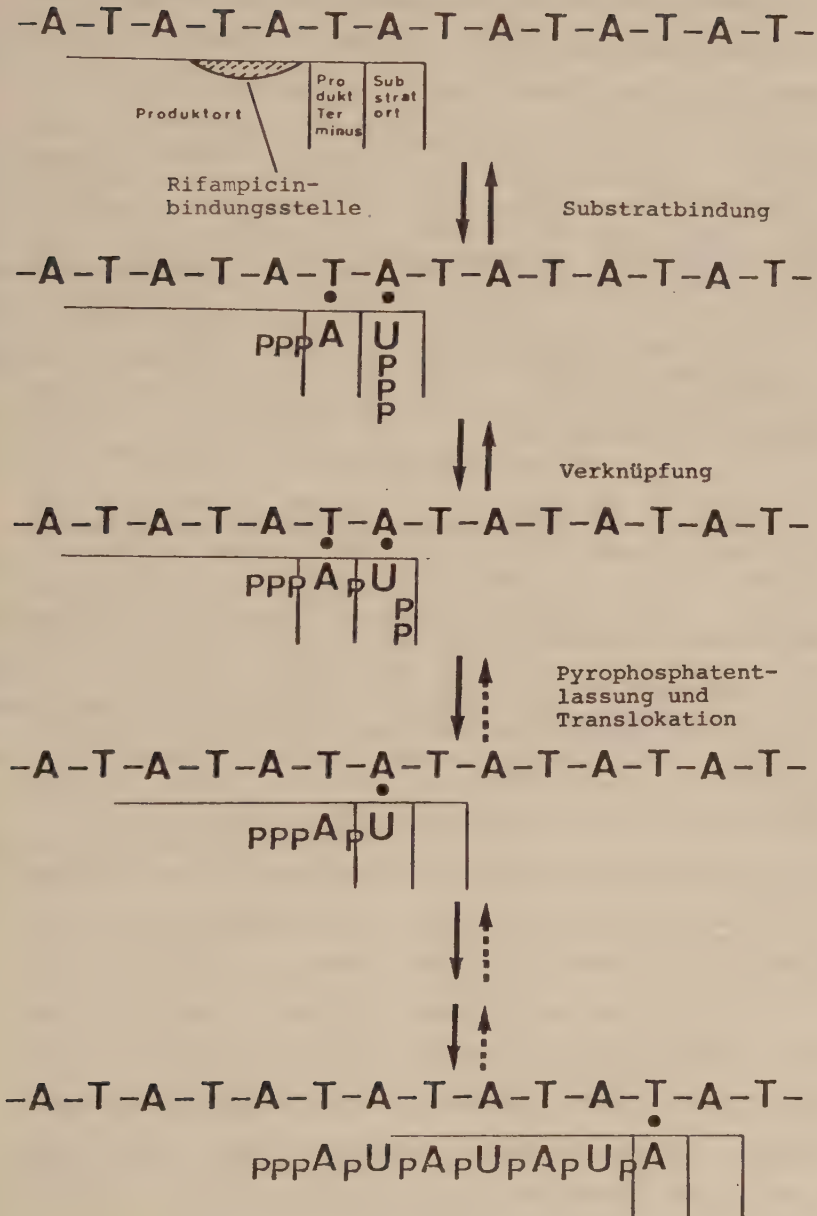
Nach dem Krakow'schen Modell hat das Enzym drei Orte, die in die Substrat- bzw. Produktbindung involviert sind. Es handelt sich um die Produktbindungsstelle, den Produkt-Terminus-Ort und die Substratbindungsstelle.

Zuerst erfolgt die Bindung des Initiations-ATPs an den Produkt-Terminus-Ort, dann die des UTPs in die Substratbindungsstelle.*)

Nach der Verknüpfung findet die Translokation des Produktes und die Dissoziation des Pyrophosphates statt. Die Substratbindungsstelle wird wieder frei und kann das nächste Elongationssubstrat binden. Wiederholte Verknüpfungen, Translokationen und Substratbindungen in zyklischer Folge

*) Von Smagowicz und Scheit (1977) und McClure et al. (1978) wurde gezeigt, daß die Bindung der Substrate geordnet erfolgt.

Binärer Komplex



sorgen für die Elongation des Oligonukleotides. Dabei wird dessen Bindung an die RNA-Polymerase stärker, weil sich die Zahl der Wechselwirkungen mit dem Produktbindungsort vermehrt.

Für die Interpretation ihrer Ergebnisse machten Krakow und Fronk drei Grundannahmen: 1. Der Translokationsschritt erfolgt wesentlich langsamer, wenn ein Pyrimidin die 3'terminale Base ist. 2. Die Translokation ist irreversibel und 3. ein pyrophosphorolytischer Ausbau des letzten Nukleotides ist nur so lange möglich, wie noch keine Translokation erfolgt ist.

Die Tatsache, daß Punkt zwei, d.h. die Irreversibilität des Translokationsschrittes, eindeutig widerlegt ist (in der Skizze ist das durch die gestrichelt gezeichneten Reaktionspfeile berücksichtigt) hat auch Konsequenzen für die erste Annahme, wenn man die Beobachtung, daß bei der Pyrophosphorolyse eines ternären Komplexes nie U-Komplexe aufgetaucht waren, hinzunimmt. Man muß dann nämlich schlußfolgern, daß die Umkehrung des Translokationsschrittes, also die Verschiebung des 3'terminalen Nukleotidrestes vom Produkt-Terminus in die Substratbindungsstelle für den UMP-Rest schnell erfolgt, und daß daher das G l e i c h g e w i c h t  nichttransloziert für die Empfindlichkeit gegen Pyrophosphat entscheidend ist. Das bedeutet aber nichts anderes, als daß translozierte U-Komplexe thermodynamisch instabiler sind, als die entsprechenden A-Komplexe.

Das Stichwort "Stabilität" erinnert an die Unterschiede in der Dissoziationsgeschwindigkeit ternärer Initiationskomplexe im A- bzw. im U-Raster. Möglicherweise hat die leichte Pyrophosphorolyse der ...ApU-Bindung und der schnelle Zerfall der U-endenden Initiationskomplexe die gleiche Ursache: Solange die Oligonukleotide kurz sind, und die Stabilisierung durch die Wechselwirkungen mit der Produktbindungsstelle noch relativ klein ist, hat die Translokation des endständigen Uridinnukleotides in den Produkt-Terminus-Ort eine schnelle Dissoziation zur Folge. Die Dissoziation längerer Oligonukleotide ist erschwert, so daß stattdessen eine Pyrophosphorolyse erfolgt.

In das skizzierte Reaktionsschema läßt sich auch noch eine Vorstellung darüber einbringen, auf welche Weise Rifampicin seine Komplex-destabilisierende Wirkung ausüben könnte. Es könnte an den Produktort binden und dadurch die Wechselwirkungen zwischen naszierender RNA und Enzym stören. Einmal gebundenes Transkript dagegen könnte dafür sorgen, daß die Rifampicinbindungsstellen für das Antibiotikum unzugänglich werden.

E MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Salze:	Merck, Darmstadt
Triäthylamin:	Merck, Darmstadt
p-Toluolsulfonylchlorid:	Merck, Darmstadt
Gelatine:	Merck, Darmstadt
Aktivkohle (0.3-0.5 mm im Durchmesser) :	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau:	Merck, Darmstadt
Nukleosidtriphosphate:	Boehringer, Mannheim
HPLC-gereinigte Nukleosidtriphosphate:	ICN, Cleveland
^{14}C -ATP:	NEN, Dreieich
^{32}P -Pyrophosphat:	NEN, Dreieich
^{32}P -Phosphorsäure:	NEN, Dreieich
α ^{32}P -Nukleosidtriphosphate:	Amersham Buchler, Braun- schweig
γ ^{32}P -ATP:	Amersham Buchler, Braun- schweig
Rifampicin:	Ciba AG, Basel
Natriumdodecylsulfat:	Bio-Rad, Richmond (Calif.)
Acrylamid:	BRL, Gaithersburg
N,N'-Methylenbisacrylamid:	BRL, Gaithersburg
Röntgenfilm (X-Ray 90):	Linhard, München
Verstärkerfolie (Trimax):	3M, Italien

Borsäure:	Sigma, St. Louis
Tris(hydroxymethyl)amino-	
methan:	Sigma, St. Louis
Polymin P:	BASF, Ludwigshafen
Orange G:	Serva, Heidelberg
Xylen-Cyanol:	Serva, Heidelberg

2. Materialien für die Chromatographie:

Phosphocellulose:	Whatman, New Jersey
DEAE-Cellulose:	Whatman, New Jersey
Polyäthylenimin (PEI)-Cellu-	
lose-Dünnschichtfolien (mit	
Fluoreszenzindikator):	Merck, Darmstadt
Sepharose 4B:	Pharmacia, Uppsala
DNA-Cellulose wurde nach Alberts <u>et al.</u> (1968) herge-	
stellt.	

3. Nukleinsäuren und Enzyme

poly[d(A-T)] wurde von A. Gierl (Dissertation, Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, in Vorbereitung) präpariert.

DNA aus den Bakteriophagen T4, T7-Wildtyp und T7-D111 wurde aus den entsprechenden Bakteriophagen durch Phenolextraktion gewonnen (Schuster et al., 1956; Schäfer, 1972). Die Phagen stammten aus der Sammlung von Professor Zillig.

RNA-Polymerase wurde aus E.coli B nach Zillig et al.

(1970) isoliert. Durch zusätzliche Chromatographie an T4-DNA-Cellulose (Alberts et al., 1968) wurden Vollenzym und Coreenzym voneinander getrennt. Der Sättigungsgehalt des Enzyms mit σ wurde nach Hansen und Mc Clure (1979) überprüft. Gegebenenfalls wurde isoliertes σ bis zur Sättigung dazugegeben.

σ wurde nach Burgess und Travers (1971) isoliert.

Anorganische Pyrophosphatase war von Boehringer/Mannheim

Ribonuklease A war von Worthington

Ribonuklease T2 war von Sankio/Tokio

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) war von Boehringer/Mannheim

4. Puffer

Niedrigsalzpuffer: 30 mM Tris-HCl pH 7.9, 60 mM Ammoniumchlorid, 6 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Merkaptoäthanol

Stop-Puffer: 9 M Harnstoff, 100 mM EDTA, 0.06 % Xylen Cyanol, 0.06 % Bromphenolblau und 0.06 % Orange G. Der pH wurde mit KOH auf einen Wert von 8 eingestellt.

Triäthylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer): Triäthylamin wurde eine Stunde über p-Toluolsulfonylchlorid im Rückfluß gekocht und dann abdestilliert. Unter Eiskühlung wurde in ein heterogene Gemisch aus Wasser und Triäthylamin solange Kohlendioxid eingeleitet, bis der pH-Wert der inzwischen homogenen Lösung kleiner als 7.8 war. Die so hergestellten Stammlösungen waren 2 M.

5. Allgemeine Reaktionsbedingungen

Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle Reaktionen unter Niedrigsalzbedingungen vorgenommen (vgl. "Niedrigsalzpuffer"). Die Konzentration von DNA und poly[d(A-T)] war immer 0.1 mg/ml. Die Konzentration der RNA-Polymerase war bei Benutzung von poly[d(A-T)] als Matrize 0.1 mg/ml, bei Benutzung von T7- oder T7-D111-DNA 20 µg/ml. DNA und Enzym wurden grundsätzlich 10 Minuten gemeinsam bei 22 °C bzw. 30 oder 37 °C inkubiert, bevor Substrate dazugegeben wurden. Rifampicin wurde, außer in dem Versuch in Abb. 15, in einer Konzentration von 20 µg/ml verwendet.

6. Konzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung der RNA-Polymerasekonzentration wurde nach Heil und Zillig (1970) vorgenommen. Die Konzentrationen von ApU, pppApU, pppApUpA und pppApUpApU wurden spektroskopisch ermittelt. Für die molaren Extinktionen bei 260 nm wurde angenommen, daß sie sich aus der Summe der Extinktionen ihrer Basen ergeben. Für pppApUpA wurde die Berechtigung dieser Annahme überprüft. Dazu wurde das Trinukleotid aus UTP und ^{14}C -ATP mit bekannter spezifischer Radioaktivität synthetisiert. Für die Konzentration dieser Verbindung ergab sich aus der spektroskopischen Bestimmung und aus der Messung der Radioaktivität nahezu der gleiche

Wert. Die Beziehungen zwischen Extinktionen und Konzentrationen sind die folgenden:

ApU bzw. pppApU: 1 mM=25.3 OD

pppApUpA: 1 mM=40.6 OD

pppApUpApU: 1 mM=50.6 OD

7. Konstruktion eines Mikrofiltrators

Mikrofiltratoren dienten der Konzentrierung von hochmolekularen Substanzen. Sie wurden aus einzelnen Kapillarmembranen hergestellt, die von der Firma Berghof (Tübingen) bezogen wurden. Es wurden Membranen benutzt, die eine Grenzdurchlässigkeit für Moleküle mit einem Molekulargewicht = 50 000 hatten. Die Länge der Kapillarmembran richtete sich nach dem gewünschten Endvolumen. Die Konstruktion und Wirkungsweise des Mikrofiltrators geht aus der folgenden Skizze hervor:



A: Anschlußlöcher
für die Zufüh-
rung der zu kon-
zentrierenden
Lösung

B: Anschlußlöcher
für Vakuum

In die Anschlußlöcher A können Schläuche gesteckt werden, durch die die zu konzentrierende Probe zu- bzw. abgeführt

wird. Über das Loch B kann das Gefäß evakuiert werden, was zu einem Austreten der niedermolekularen Substanzen aus der Membran führt. Alternativ zur Vakuumfiltration läßt sich mit dem Mikrofiltrator eine Konzentrierung auch durch Zentrifugation erreichen. In diesem Fall werden Eppendorfspitzen in die Anschlußlöcher gesteckt und mit der Lösung gefüllt. Zentrifugation bei ca. 2500 upm in einer Christ-Minifuge führt zur Ultrafiltration. Mit kurzen Kapillarmembranen lassen sich auf diese Weise bequeme Endvolumina von 10 μ l erreichen.

8. Polyacrylamidgelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Oligonukleotiden wurde auf 200x400x0.5 mm Polyacrylamid-Harnstoffgelen, wie sie für die DNA-Sequenzierung gebräuchlich sind (Maxam & Gilbert, 1980), durchgeführt. Die Gele enthielten 20 % Acrylamid, 0.67 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 7 M Harnstoff, 50 mM Tris-Borat (pH 8.3). Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von 0.05 % TMED und 0.3 % Persulfat gestartet. Vor dem Probenauftrag wurden die Gele für ca. eine Stunde bei 700 V vorelektrophoretisiert. Die Elektrophorese der Proben selbst dauerte zwischen 5 und 14 Stunden bei 400 - 1200 V. Auf das Gel wurden gewöhnlich pro Spur zwischen 2 und 5 μ l-Proben mit Hilfe eines ausgezogenen Polyäthylenschlauches aufgetragen. Vorher wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit "Stop-Puffer" gemischt. Proben mit höherer Salzkonzentration als üblich (Niedrigsalzpuffer)

wurden mit Wasser verdünnt.

9. Autoradiographie

Die Positionen der gelelektrophoretisch- oder dünnschicht-chromatographisch aufgetrennten radioaktiven Substanzen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Gele bzw. die Dünnschichtplatten wurden in Haushaltsfolie eingepackt und die Röntgenfilme wurden unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70°C der Strahlung ausgesetzt.

10. Quantitative Bestimmung der im Gel aufgetrennten Produkte

Die Radioaktivität der einzelnen Banden, deren Cerenkov-Strahlung nach dem Ausschneiden aus dem Gel bestimmt wurde, wurde in Beziehung zur insgesamt aufgetragenen Radioaktivität gesetzt. Jene wurde aus der Differenz der Radioaktivität in den Polyäthylenschläuchen vor und nach dem Auftrag der Probe auf das Gel bestimmt.

11. Elution von Oligonukleotiden aus dem Acrylamidgel

Die interessierenden Banden wurden aus dem Acrylamidgel herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden zerstoßen und mit Wasser gemischt. Nach mehrstündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde das Acrylamid durch Zentrifugation beseitigt. Der Überstand wurde auf ein DEAE-Säulchen (aus einer

Pipettenspitze) gegeben. Nach ausgebigem Waschen mit Wasser wurde das Oligonukleotid mit 1 M TEAB-Puffer eluiert und lyophilisiert.

12. Dünnschichtchromatographie

Alle dünnschichtchromatographischen Trennungen wurden auf 40x40 cm großen Polyäthylenimin-Cellulose-Dünnschichtplatten durchgeführt. Als Laufmittel wurde ein Kaliumphosphatpuffer (pH 8) mit 10 % Äthanol verwendet. Die Kaliumphosphatkonzentration richtete sich nach dem jeweiligen Trennproblem. Eine gute Trennung von UTP, ATP, pppApU und pppApUpA war mit 0.2 M Puffer zu erreichen. Die Rf-Werte relativ zum UTP waren die folgenden: UTP: 1, ATP: 0.53, pppApU: 0.43 und pppApUpA: 0.24. Höhere Phosphatkonzentrationen (0.3-0.4 M) eigneten sich zur Trennung längerer Oligonukleotide. Das auf einer Strecke von 1 cm aufgetragene Probenvolumen betrug normalerweise 10 μ l. Zur Erzeugung einer einheitlichen Elutionsfront wurden die Dünnschichtplatten nach dem Auftrag der Proben zunächst für 15 Minuten in 5 mM Phosphatpuffer gestellt. Unter diesen Bedingungen bleiben die oben genannten Substanzen an der Auftragslinie liegen (Nukleoside und Dinukleosidmonophosphate wandern auch bei dieser geringen Ionenstärke). Die Position der radioaktiven Substanzen wurde durch Autoradiographie festgestellt. Für eine quantitative Bestimmung wurde die Cerenkov-Strahlung der ausgeschnittenen Banden ermittelt und in Beziehung zur aufgetragenen Radioaktivität gesetzt.

13. Messung des Pyrophosphataustausches

Der Pyrophosphataustausch wurde durch den Einbau von ^{32}P -Pyrophosphat in die entsprechenden Nukleosidtriphosphate verfolgt. 100 μl Proben wurden mit je 1 ml einer Suspension von gekörneter aktivierter Aktivkohle in 10 % er Trichloressigsäure mit 0.2 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ gemischt und dann durch Watte, mit der eine große Eppendorfspitze unten verschlossen war, gefiltert. Gewaschen wurde mit ca. 20 ml 5 % er Trichloressigsäure und mit ca. 5 ml Wasser. Die Nukleosidtriphosphate wurden 10x mit 1 ml Elutionspuffer (48 % Wasser, 50 % Äthanol, 2 % konzentrierte Ammoniaklösung) von der Aktivkohle eluiert. Die Cerenkov-Strahlung der vereinigten Eluate wurde gemessen. Zur Bestimmung des Verhältnisses des Pyrophosphataustausches in das UTP bzw. in das ATP wurde nur 2 mal mit je 500 μl eluiert. Im zweiten Eluat befand sich die Volumensradioaktivität. Eine Probe des Eluates wurde dünnschichtchromatographisch analysiert. Vorversuche zeigten, daß durch die Prozedur keine verfälschende Anreicherung eines Nukleotides zu Ungunsten des anderen erfolgte.

14. Spaltung von pppApUpA mit RNase T2

8 μl einer Lösung mit gereinigtem spezifisch markiertem Trinukleotid wurden mit .1 μl T2-Puffer (0.2 M Ammoniumacetat, pH 4.5) und 1 μl T2-RNase (1 U/ μl) gemischt und 2

Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

15. Test auf Reinheit von Nukleosidtriphosphaten

Die üblichen Reinheitsprüfungen für ATP und UTP durch Dünnschichtchromatographie waren nicht empfindlich genug für den Nachweis von störenden gegenseitigen Verunreinigungen. Die Reinheit der Nukleosidtriphosphate wurde deshalb mit einem funktionellen Test überprüft: Ein isolierter ternärer Komplex mit markiertem pppApUpA wurde mit ATP bzw. UTP inkubiert. Im ersten Fall sollte überhaupt keine Verlängerung des Oligonukleotides erfolgen, und im zweiten sollte sie auf einen einzigen Schritt begrenzt sein. Bei einer Verunreinigung des einen Nukleotides mit dem anderen würde das pppApU um eine ganze Reihe von Nukleotidresten verlängert werden. Die verwendeten nichtmarkierten Nukleosidtriphosphate und das $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP erwiesen sich in diesem Test als sehr rein, während das käufliche $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP häufig mit nichtmarkiertem ATP verunreinigt war.

16. Nachreinigung von $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP

Viele Chargen des käuflichen $\alpha^{32}\text{P}$ -UTPs enthielten störende Mengen von nichtmarkiertem ATP. Zur Reinigung wurde das UTP auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetragen und mit 0.15 M Phosphatpuffer als Laufmittel chromatographiert. Die Position des UTPs wurde durch Autoradiographie zunächst sichtbar gemacht, und die Bande wurde dann unter

gleichzeitigem Absaugen aus der Dünnschichtplatte ausgekratzt. Dazu wurde eine große Eppendorfspitze (1 ml), von deren spitze etwa 1 cm abgeschnitten worden war, mit dem dünnen Ende in einen Schlauch gesteckt und mit einer Wasserstrahlpumpe oder Ölpumpe verbunden. Mit der Kante der großen Öffnung der Pipettenspitze wurde das Material von der Dünnschichtplatte geschabt. Die abgelösten und abgesaugten Partikel sammelten sich auf einem Wattepfropfen, der zuvor in die Spitze gestopft worden war. Die Pipettenspitze mit dem Polyäthylenimin wurde wie eine Chromatographiesäule behandelt. Durch Anlegen eines Puffergradienten mit 0.01 bis 0.3 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat (TEAB) wurde das UTP eluiert. Der Puffer wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Reste vom Triäthylammoniumhydrogencarbonat ließen sich durch Aufnahme der Probe in 50 % Äthanol und durch eine erneute Trocknung an der Lyophille beseitigen.

17. Synthese von ApU

Das käufliche ApU zeigte in der Dünnschichtchromatographie erhebliche Verunreinigungen. Statt seiner Nachreinigung wurde eine Neusynthese vorgenommen. 1 ml Reaktionsgemisch mit 100 µg RNA-Polymerase, 100 µg poly[d(A-T)], 1 mM ATP und 1 mM UTP wurde unter Mittelsalzbedingungen (30 mM Tris-HCl, 120 mM Ammoniumchlorid, 60 mM Magnesiumchlorid) eine Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung der unumgesetzten Substrate, des entstandenen Pyrophosphates und der übrigen Salze wurde der Reaktionsansatz durch eine

Kapillarmembran mittels Zentrifugation ultrafiltriert und das hochmolekulare Produkt 2 mal mit 10 mM Tris-Puffer (pH 8) gewaschen. Das poly[r(A-U)] wurde dann in 200 μ l 10 mM Tris-Puffer aufgenommen und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit RNase A (Endkonzentration: 0.1 mg/ml) behandelt. Das entstandene ApUp wurde durch Ultrafiltration von den hochmolekularen Substanzen abgetrennt und dann mit Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach einer weiteren Ultrafiltration wurde das im Filtrat befindliche ApU durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer μ -Bondapak-NH₂-Säule (Waters; Milford, Massachusetts) gereinigt (mobile Phase: 5 mM Ammoniumphosphatpuffer pH 4.5 mit 10% Äthanol). Zur Beseitigung des Phosphates wurde das ApU nach dem Ansäuern der Lösung mit HCL an Aktivkohle adsorbiert. Nach ausgebigem Waschen mit Wasser wurde das ApU mit Elutionspuffer (Wasser:Ammoniaklösung:Äthanol; 48:2:50) eluiert, dann lyophilisiert und schließlich in 100 μ l Wasser aufgenommen.

18. Separate Herstellung von pppApU

Im Anschluß an die Charakterisierung der Reaktionsprodukte, die in Gegenwart von Rifampicin im poly[d(A-T)]-System gebildet wurden, erfolgte die Herstellung von pppApU nur noch an der synthetischen Matrize. Vorher wurde T7-DNA als Matrize benutzt. 0.1 mg/ml T7-DNA und 20 μ g/ml RNA-Polymerase wurden in Gegenwart von Rifampicin 24 Stunden mit 1 mM ATP und 1 mM UTP bei 30 °C inkubiert. Diese Methode wurde

auch für die Herstellung des ^{14}C -markierten pppApus, das nach Verlängerung zum doppelt markierten Trinukleotid für den Konstitutionsbeweis verwendet wurde, angewandt. Die Reinigung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (vgl. "Nachreinigung von UTP").

19. Separate Herstellung von pppApUpA und von pppApUpApU

pppApUpA und pppApUpApU ließen sich enzymatisch aus pppApU bzw. pppApUpA und ATP bzw. UTP herstellen. Dazu wurden poly[d(A-T)] und RNA-Polymerase mit dem Di- oder Trinukleotid (0.1 mM und dem entsprechenden Nukleosidtriphosphat (0.1 mM) 6 Stunden bei 22 °C inkubiert. Die Ausbeuten waren jedoch ziemlich gering, so daß dieses Verfahren nur am Anfang der Arbeit oder zur Synthese von speziell markierten Verbindungen eingesetzt wurde. Die Isolierung der Reaktionsprodukte erfolgte in diesem Fall auf dünnschichtchromatographischem Weg.

20. Gemeinsame Herstellung von Di-, Tri- und Tetranukleotid

Die Oligonukleotide ließen sich in brauchbaren bis guten Ausbeuten gleichzeitig aus einem einzigen Reaktionsansatz mit 0.1 mg/ml poly[d(A-T)], 0.1 mg/ml RNA-Polymerase, 0.02 mg/ml Rifampicin, 2 mM ATP und 1 mM UTP gewinnen. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden 9/10 des Volumens durch eine Kapillarmembran ultrafiltriert. Die Ultrafiltration wurde

auf die Art, wie sie für die Konzentrierung des ternären Komplexes beschrieben wurde, durchgeführt. Das ermöglichte eine schonende Konzentrierung von Enzym und DNA. Nach dem Auffüllen mit einem ATP, UTP und Rifampicin enthaltenden Puffer auf das ursprüngliche Volumen (üblicherweise 30 ml), wurde die Oligonukleotidsynthese fortgesetzt. Das selbe Enzym-DNA-Gemisch ließ sich auf diese Weise bis zu einer Dauer von 10 Tagen benutzen. Aus den Ultrafiltraten wurden die Oligonukleotide durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose isoliert. Für die Aufarbeitung von 30 ml Filtrat wurde eine 1.5x70 cm-Säule verwendet. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit ca. 500 ml 0.01 M TEAB-Puffer gespült. Eluiert wurde mit einem TEAB-Gradienten von 0.01 M bis 1 M mit einem Volumen von 2x1.5 l. Die Fraktionen wurden Dünnschichtchromatographisch analysiert. Die vereinigten Gipfelfraktionen wurden lyophilisiert. Die Produkte wurden wiederholt in 50 % Äthanol aufgelöst und lyophilisiert und schließlich in Wasser aufgenommen.

21. Isolierung eines ternären Initiationskomplexes mit Trinukleotid

Zu Reaktionsansätzen, in denen sich ein binärer poly[d(A-T)]-RNA-Polymerase-komplex bereits gebildet hatte, wurden 0.05 mM pppApU (bzw. ApU) und 0.005 mM ATP gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 22 °C wurde das Reaktionsgemisch auf eine Sepharose 4B-Säule aufgetragen. Für Reaktionsvolumina von 0.2 - 0.6 ml wurden 40 cm lange Säulen

mit einem Durchmesser von 1 cm verwendet. Für die Chromatographie von 5 μ l-Ansätzen wurden Säulen mit den Abmessungen 30x0.2 cm benutzt.

22. Isolierung ternärer Initiationskomplexe im A-Raster

Binäre poly[d(A-T)]-Polymerase-Komplexe wurden 5 Minuten mit 0.05 mM pppApU, 0.1 μ M ATP und 0.1 μ M UTP bei 22 °C inkubiert. Die Trennung der ternären Komplexe von den Substraten erfolgte durch Chromatographie an Sepharose 4B.

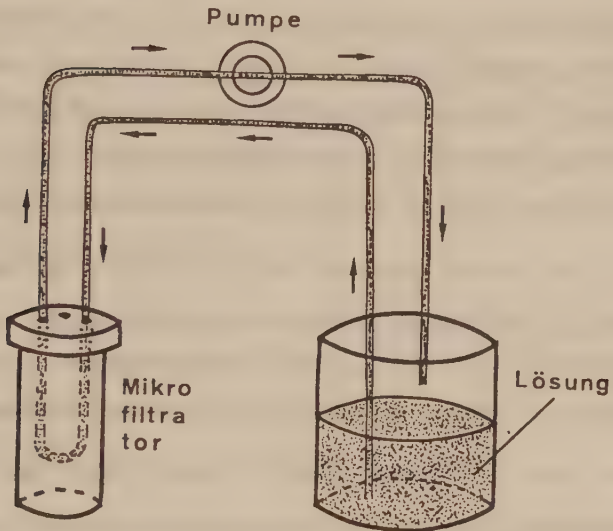
23. Isolierung ternärer Initiationskomplexe im U-Raster

Isolierte und konzentrierte ternäre Initiationskomplexe im A-Raster wurden mit 10 μ M UTP bei 22 °C inkubiert und dann auf eine Sepharose 4B-Säule aufgetragen. Die isolierten U-Komplexe enthielten noch Komplexe im A-Raster oder gingen leicht in jene über (vgl. Ergebnisse Teil 3). Eine erneute Inkubation mit UTP und eine anschließende Chromatographie an Sepharose 4B lieferte ternäre Komplexe, die sich nahezu vollständig im U-Raster befanden.

24. Konzentrierung von ternären Komplexen

Bei der Konzentrierung von isolierten ternären Komplexen mit Hilfe von Mikrofiltratoren war es besonders wichtig, dafür zu sorgen, daß möglichst keine lokalen Überkonzentrationen auftraten. Das wurde durch ein ständiges Umpumpen der

zu konzentrierenden Lösung erreicht. Die nachstehende Skizze soll die Anordnung verdeutlichen.



F ZUSAMMENFASSUNG

Die Initiation einer RNA-Kette beginnt mit der Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung und geht dann fließend in die Elongationsphase über. Beginn und Ende dieses Transkriptionsabschnittes lassen sich durch den spezifischen binären Enzym-DNA-Komplex auf der einen Seite und den stabilen ternären Elongationskomplex auf der anderen Seite charakterisieren. Die schrittweise Umwandlung des einen in den anderen Komplex wurde in dieser Arbeit verfolgt.

1. Ein binärer Komplex aus poly[d(A-T)] und RNA-Polymerase aus E. coli akzeptiert Oligonukleotide als Initiationssubstrate. Di-, Tri- und Tetranukleotide lassen sich spezifisch jeweils um einen Nukleotidrest verlängern.

2. Die aus poly[d(A-T)], Enzym und den einzelnen Oligonukleotiden bestehenden ternären Komplexe weisen eine sehr unterschiedliche Stabilität auf. Die Stabilität ist sowohl durch die Sequenz als auch durch die Länge des Oligonukleotides bestimmt. Ein Uridin statt eines Adenosins am 3'-terminalen Ende der RNA sorgt für eine verstärkte Dissoziation des Komplexes. Ab einer RNA-Länge von sechs Nukleotidresten sind die ternären Komplexe in beiden Rastern stabil genug, um isoliert werden zu können.

3. Mit dem isolierten Trinukleotid pppApUpA läßt sich zeigen, daß man einen stabilen ternären Komplex direkt aus seinen Komponenten bilden kann, daß also die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung keine unabdingbare Voraussetzung für

seine Entstehung ist.

4. In Gegenwart des Antibiotikums Rifampicin entstehen an poly[d(A-T)] und an nativer DNA neben dem Dinukleotid auch längere Oligonukleotide.

5. Die transkriptionshemmende Wirkung des Antibiotikums Rifampicin ist durch seinen destabilisierenden Einfluß auf die Bindung zwischen dem Oligonukleotid und dem aktiven Komplex erklärbar, da die Konzentrationserniedrigung von intermediär gebundenem Oligonukleotid die Wahrscheinlichkeit eines Elongationsschrittes reduziert.

6. Die seit langem bekannte Resistenz gegen Rifampicin, die ein ternärer Elongationskomplex hat, läßt sich auch schon für einen ternären Initiationskomplex zeigen, bei dem die "RNA" nicht länger als ein Trinukleotid ist.

7. Die RNA in ternären Komplexen läßt sich pyrophosphorolytisch abbauen. Die Transkriptionsreaktion ist also im Prinzip reversibel.

8. Der pyrophosphorolytische Ausbau des 3'-terminalen Nukleotides erfolgt schnell, wenn es sich um ein UMP und langsam, wenn es sich um ein AMP handelt.

9. Der leichte Ausbau eines endständigen UMPs auf der einen Seite und die geringe Stabilität von ternären Initiationskomplexen im U-Raster auf der anderen Seite führen zur Diskussion eines Transkriptionsmodells, das für diese Beobachtungen eine gemeinsame Ursache annimmt.

G LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B. M., Amodio, F. J., Jenkins, M., Gutman, E. D. and Ferris, F. L. (1968) Studies with DNA-cellulose chromatography. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 289 - 305
- Anthony, D. D., Zeszotek, E. and Goldthwait, D. A. (1966) "Initiation by the DNA-Dependent RNA Polymerase", Proc. Nat. Sci. USA 56, 1026-1033
- Bordier, C. (1974) "Inhibition of Rifampicin-Resistent RNA Synthesis by Rifampicin-RNA Polymerase Complexes", FEBS Lett. 45, 259-262
- Bremer, H., Konrad, M., Gaines, K. and Stent, S. (1965) J. Mol. Biol. 13, 540
- Burgess, R. R. and Travers, A. A., (1971) "Purification of the RNA Polymerase Sigma Factor, in 'Methods in Enzymology' (Grossmann, L. and Moldave, K., eds.), Academic Press New York and London, Vol. XXI, p. 500-506
- Carpousis, J. A., and Gralla, J. D. (1980) "Cycling of Ribonucleic Acid Polymerase to Produce Oligonucleotides during Initiation in Vitro at the lac UV5 Promoter
- Dennis, D., Hsu, C. Y. J. and Kinsella, L. (1981). RNA polymerase: correlation between transcript length, sigma release and formation of a stable ternary complex resistant to rifampicin or a salt jump challenge. Fed. Proc. 40, 1766-1766
- Di Mauro, E., Snyder, L., Marino, P., Lamberti, A., Coppo, A. and Tocchini-Valentini, G. P. (1968) "Rifampicin sensiti-

- vity of Components of DNA-Dependent RNA Polymerase"
Nature 222, 533-537
- Eilen, E. and Krakow, J. S. (1973) "Azotobacter vinelandii
RNA Polymerase XI. Effekt of Transcription on Rifampicin Binding", Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 282-290
- Gralla, J. D., Carpousis, A. J. and Stephano, J. E. (1980)
"Productive and Abortive Initiation of Transcription in Vitro at the lac UV5 Promoter
- Hansen, U. M. and McClure W. R. (1980, a) "Role of the Sigma
Subunit of Escherichia coli RNA Polymerase in Initiation"
J. Biol. Chem. 255, 9564-9570
- Hansen, U. M. and McClure, W. R. (1980, b) "A Noncyclic
Activity Assay for the Sigma Subunit of Escherichia coli
RNA Polymerase" J. Biol. Chem. 245, 5713-5717
- Hartmann, G., Honikel, K. O., Knüsel, F. and Nüesch, J.
(1967) "The specific Inhibition of the DNA-Directed RNA
Synthesis by Rifampicin", Biochim. Biophys. Acta 145,
843-844
- Hayward, R. S. (1976) "DNA Blockade by Rifampicin-Inactivated
Escherichia coli RNA Polymerase, and Its Amelioration
by a Specific Mutation", Eur. J. Biochem. 71, 19-24
- Hinkle, D. C., Mangel, F. W. and Chamberlin, M. J. (1972)
"Studies of the Binding of Escherichia coli RNA Polymerase
to DNA IV. The Effekt of Rifampicin on Binding and on
RNA Chain Initiation", J. Mol. Biol. 70, 209-22
- Johnston, D. E. and McClure, W. R. (1976) "Abortive Initia-
tion of In Vitro RNA Synthesis on Bacteriophage lambda-
DNA", in "RNA Polymerase (Lossick, R, and Chamberlin,

- M. J., eds.) Cold Spring Harbour Laboratory, p. 413-428
- Kasavetis, G. A. and Chamberlin, M. J. "Pausing and Termination of Transcription within the Early Region of Bacteriophage T7 DNA in Vitro" J. Biol. Chem. 256, 2777-2786
- Kasavetis, G. A., Kaya, K. M. and Chamberlin, M. J. (1981) "Escherichia coli RNA Polymerase-Rifampicin Complexes Bound at Promoter Sites Block RNA Chain Elongation by Escherichia coli RNA Polymerase and T7-Specific RNA Polymerase", Biochemistry 17, 5798-5
- Kessler, C. (1980) "Die Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf den Beginn der Escherichia coli RNA Polymerase Reaktion", Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Kessler, C., Mi Huaifeng and Hartmann, G. R. (1982) "Competition of Rifampicin with Binding of Substrate and RNA to RNA Polymerase", Eur. J. Biochem.. 122, 515-518
- Kingston, E. R. and Chamberlin, M. J. (1981) "Pausing and Attenuation of in Vitro Transcription in the *rrnB* Operon of E. coli" Cell 27, 523-531
- Krakow, J. S. and Fronk, E. (1969) "Acetobacter vinelandii Ribonucleic Acid Polymerase VIII. Pyrophosphorolytic Exchange", J. Biol. Chem. 244, 5988-5993
- Lill, U. I. and Hartmann, G. R. (1973) "On the Binding of Rifampicin to the DNA-Directed RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 38, 336-345
- Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) in Methods in Enzymology Vol. 65, 495-560
- Munson, L. M. and Resnikoff, W. S. (1981) "Abortive Initia-

- tion and Long Ribonucleic Acid Synthesis" Biochemistry 20, 2081-2085
- Nierman, W. C. and Chamberlin M.J. (1979) "Studies of the RNA Chain Initiation by Escherichia coli RNA Polymerase Bound to T7 DNA" J. Biol. Chem. 254, 7921-7926
- McClure, W. R. and Cech, C. L. (1978) "On the Mechanism of Rifampicin Inhibition of RNA Synthesis", J. Biol. Chem. 253, 8949-8956
- McClure, W. R., Cech, C. L. and Johnston, D. E. (1978) "A Steady State Assay for the RNA Polymerase Initiation Reaction", J. Biol. Chem. 253, 8942-8948
- McConnel, D. J. (1979) "The DNA Sequence at the T7 C Promoter", Nucleic Acids Res. 6, 525-544
- Oen, H. and Wu, C.-W. (1978) "DNA-Dependent Single-Step Addition Reactions Catalysed by Escherichia coli RNA Polymerase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1778-1782
- Pribnow, D. (1975) "Bacteriophage T7 Early Promoters: Nucleic Sequences of Two RNA Polymerase Binding sites." J.Mol. Biol. 99, 419-443
- Rohrer, H. and Zillig, W. (1977) "Studies on the Transcription Complex of Escherichia coli RNA Polymerase", Eur. J. Biochem. 79, 401-409
- Schäfer, R., Zillig, W. and Zechel, K. (1973) "A Model for the Initiation of Transkription by DNA-Dependent RNA Polymerase from Escherichia coli", Eur. J. Biochem. 33, 207-214
- Schulz, W. and Zillig, W. (1981), "Rifampicin inhibition of RNA synthesis by destabilisation of DNA-RNA polymerase-oligonucleotide-complexes", Nucleic Acid Res. 9, 6889-6905

- Schuster, H., Schramm, G. und Zillig W. (1956) "Die Struktur der Ribonukleinsäure aus Tabakmosaikvirus" "Zeitschr. f. Naturforsch. 6, 341-345
- Shimamoto, N. and Wu, C.-W. (1980) "Mechanism of Ribonucleic Acid Chain Initiation. 1. A Non-Steady-State Study of Ribonucleic Acid Synthesis without Enzyme Turnover" Biochem. 19, 849-856
- Shimamoto, N. and Wu, C.-W. (1980) "Mechanism of Ribonucleic Acid Chain Initiation. 2. A Real Time Analysis of Initiation by the Rapid Kinetic Technique" Biochem. 19, 842-848
- Shimamoto, N. and Wu, C.-W. (1981) "Mechanism of Ribonucleic Acid Chain Initiation. Molecular Pulse-Labeling Study of Ribonucleic Acid Synthesis on T7 Desoxyribonucleic Acid Template" Biochem. 20, 4745-4755
- Sippel, A. and Hartmann, G. (1968) "Mode of Action of Rifampicin on the RNA Polymerase Reaction", Biochim. Biophys. Acta 157, 218-219
- Smagowicz, W. J. and Scheit, K. H. (1977) "Steady State Kinetic Studies of Initiation of RNA Synthesis on T7 DNA in the Presence of Rifampicin", Nuc. Acids Res. 4, 3863-3876
- Smagowicz, W. J. and Scheit K.-H. (1978) "Primed Abortive Initiation of RNA Synthesis by E. coli RNA Polymerase on T7 DNA, Steady State Kinetic Studies", Nuc. Acids Res. 5, 1919-1932
- Smagowicz, W. Scheit, K.-H. (1981) "A Minimal Mechanism for Abortive Initiation of Transcription of T7 DNA" Nukl.

Acids Res. 9, 5845-5854

So, A. G. and Downey, K. M. (1970) "Studies on the Mechanism of Ribonucleic Acid-Ribonucleic Acid Polymerase Complex by the Formation of a Single Phosphodiester-Bond", Biochemistry 9, 4788-4793

Studier, F. W. (1975) "Gene 0.3 of Bacteriophage T7 Acts to Overcome the DNA Restriction System of the Host" J. Mol. Biol. 94, 283-295

Sylvester, J. E. and Cashel, M. (1980) "Stable RNA-DNA-RNA Polymerase Complexes Can Accompany Formation of a Single Phosphodiester Bond" Biochemistry 19, 1069-1074

Stefano, J. E. and Gralla, J. (1979) "Lac UV5 Transkription in Vitro. Rate Limitation Subsequent to Formation of an RNA Polymerase-DNA Complex" Biochemistry 18, 1063-1067

Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K. and Staehlin, M. (1968) "Interaction of Rifampicin with Bacterial RNA Polymerase", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 667-673

Zillig, W., Zechel, K. and Halbwachs H. (1970) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 221-224

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
T4-DNA	DNA des Bakteriophagen T4
T7-DNA	DNA des Bakteriophagen T7
poly[d(A-T)]	Poly-desoxy-adenyl-desoxy-thymidylsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Ci	Curie
cpm	"counts per minute" (gemessene Zerfälle in der Minute)
Upm	
Ump	Umdrehungen pro Minute
PEI	Polyäthylenimin
RNase	Ribonuklease
TEAB	Triäthylammoniumbicarbonat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
A-Komplexe	Ternäre-RNA-DNA-Polymerase-Komplexe, deren RNA am 3'-terminalen Ende einen AMP-Rest hat
U-Komplexe	Ternäre-RNA-DNA-Polymerase-Komplexe, deren RNA am 3'-terminalen Ende einen UMP-Rest hat

LEBENS LAUF

Name: Wolfgang Schulz

Geburtsdatum: 31. Juli 1948

Geburtsort: Waren/Müritz

Schulen:

1955 - 1961 Grundschule in Wolgast

1961 - 1968 Ratsgymnasium Rotenburg

1968 Abitur

akademische Ausbildung:

1968 - 1974 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mai 1974 Diplom-Hauptprüfung

1974 - 1975 Diplomarbeit (Infrarotspektroskopische Untersuchungen von an Aluminiumoxidoberflächen adsorbierten Carbonylverbindungen) unter Anleitung von Prof. Dr. H. Knözinger im Institut für Physikalische Chemie der Universität München

1975 - 1982 Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

